

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA

**Estudio Ultraestructural de las Conexiones  
de la Parte Ventral del Núcleo Reticular Oral del Puente  
con el Núcleo Reticular Magnocelular del  
Bulbo Raquídeo**

TESIS DOCTORAL

M<sup>a</sup> Elena Sánchez Valle  
Junio-2001

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesi. Doctoral  
con la censura de Sobresaliente "cum laude"  
Madrid, 12. Octubre - 2004

M. Rodas

Isabel Fele Arce

Isabel Fele Arce

Isabel Fele Arce



M/ TESIS, 2255

**Estudio Ultraestructural de las Conexiones  
de la Parte Ventral del Núcleo Reticular Oral del Puente  
con el Núcleo Reticular Magnocelular del  
Bulbo Raquídeo**

Trabajo de Investigación que presenta  
M<sup>a</sup> ELENA SÁNCHEZ VALLE  
para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía en la  
Universidad Autónoma de Madrid

dirigido por los Profesores

CARMEN DE LA ROZA RUIZ

y

FERNANDO REINOSO-SUÁREZ

Profesora Titular de Biología y Catedrático Emérito de Anatomía y  
Neurobiología del Departamento de Morfología de la Facultad  
de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Recs Fm: 20982

Junio 2001



Carmen de la Roza, Profesora Titular de Biología y  
Fernando Reinoso-Suárez, Catedrático Emérito de Anatomía y Neurobiología  
en la Universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR: Que Doña M<sup>a</sup> Elena Sánchez Valle ha realizado bajo su  
dirección el trabajo de su Tesis Doctoral "*Estudio  
Ultraestructural de las Conexiones de la Parte Ventral del  
Núcleo Reticular Oral del Puente con el Núcleo Reticular  
Magnocefalar del Bulbo Raquídeo*" que ha terminado con el  
mayor aprovechamiento, y que las aportaciones de este estudio  
en el campo de la Neurobiología del sueño son originales del  
autor,

Y para que conste y surta los efectos oportunos,  
firmamos en Madrid a 20 de junio de 2001.

Carmen de la Roza

Fernando Reinoso

**A mi hermano**

“A la verdad, la máquina neurótica es tan complicada: encierra tantas incógnitas, como su fina anatomía, que resulta hoy muy temerario referir el sueño a un factor histológico conocido, cuando bien pudiera ser que entrara en juego algún otro desconocido”

Santiago Ramón y Cajal, Carta al Padre Zacarías Martínez.

Recogido en “Cajal.Escritos Inéditos”. Edit. científico-médica.

(“¿Que quizá soñando estoy, aunque despierto me veo?”

Calderón de la Barca. La vida es sueño.)

## **AGRADECIMIENTOS**

No podría presentar esta tesis doctoral sin un reconocimiento previo, sincero y agradecido, hacia tantas personas en el Departamento de Morfología cuyo trabajo y ayuda han sido imprescindibles para su realización. Vaya mi cariño hacia todos ellos.

Mi más profundo agradecimiento muy especialmente al Dr. Reinoso, por su sabiduría, por su entusiasmo, por su extraordinaria categoría humana y su excepcional dedicación al trabajo, por enseñarme que el estudio científico precisa de humildad y rigor, y porque siempre encontraba un hueco para poder atenderme.

Mi agradecimiento y mi estima profundos también a la Dra. de la Roza, por todo lo que he aprendido con ella, por su perfeccionismo que tan bien ha sabido comunicarme, por la autonomía que me ha dejado en todo momento, y por la comprensión y apoyo que me ha mostrado cuando me equivocaba.

Gracias a Juana María Martínez-Mena, compañera inseparable en este Tercer Ciclo, por su labor en esta tesis y por todos los buenos ratos que hemos pasado en el laboratorio y frente a las mesas de trabajo. Y por los tiempos no tan buenos que también hemos tenido mientras realizábamos nuestras Tesis Doctorales.

Gracias a Pay Romero, además de por su inestimable trabajo en el laborioso procedimiento de la microscopía electrónica, por su simpatía, su amabilidad y su agradecible vocación docente. Gracias también a Rosa Sánchez, a Gema de la Fuente, a Begoña Rodríguez (gracias por las agradables pláticas en el pasillo) y a Milagros, por su labor en la primera parte de esta tesis y por su cordialidad. Gracias por haber intentado enseñarme toda la complejidad de las distintas técnicas de laboratorio, de importancia capital en la investigación en Neurociencia.

Gracias a Francisco Urbano, por su valiosa ayuda con el microscopio electrónico y por su increíble capacidad para convertir las relaciones profesionales en relaciones humanas: gracias a Carmen Hernández por su interés y seriedad al realizar cortes ultrafinos y por los agradables ratos que pasamos hablando de cultura y de animales de compañía; gracias a Ana Duro por las conversaciones que mantuvimos sobre la ciencia y sobre la vida, y por el interés científico que me ha transmitido; gracias a Diego Megías por nuestras charlas sobre ordenadores y por transferir su diligencia en el trabajo; gracias a Basilio Cáceres, por su ayuda siempre que la he necesitado y por sus ingentes conocimientos de Historia con los que he disfrutado y aprendido; y gracias también a Jose Álvarez, ejecutivo y doctor, por su energía y humanidad, por su atención afectuosa en tantas ocasiones. Mi más sincera gratitud hacia ellos también por darme ánimo, y por haber conseguido aguantarme durante tantas horas memorables como hemos compartido.

Gracias a todos los profesores del Departamento, tanto por su inteligencia y por sus conocimientos como por su ejemplar calidad como personas. Si no he aprendido más de ellos ha sido por mis propias limitaciones. No quisiera olvidar a ninguno puesto que a todos agradezco su generosa amabilidad, pero me gustaría mencionar someramente a aquéllos con quienes más me he relacionado durante estos años: Expresar mi agradecimiento al Dr. Martínez, anterior director del Departamento, por su buen humor constante y su carácter encantador que mejora a las personas que le rodeamos. Gracias también a la Dra. De Andrés, directora actual del Departamento, y a la Dra. Rodrigo-Angulo, gracias de corazón a ambas por la cordialidad y por el trato amable y próximo con que siempre me han obsequiado. Gracias a la Dra. Rausell, mi tutora, por las veces que me ha ayudado. Gracias al Dr. Velayos por su simpatía; al Dr. Avendaño por su carácter cercano; a la Dra. Cavada por las atenciones que ha tenido conmigo; al Dr. Llamas por su sencillez y a la Dra. Gómez-Ramos por la amabilidad y naturalidad en el trato que me ha dispensado. Gracias al

Dr. Garzón por su cordialidad y por su confianza y al Dr. De las Heras por darme ánimos y por transmitirme su experiencia mientras yo escribía (ardua y lentamente) mi tesis. Y gracias al Dr. Clascá, profesor a quien más he tratado, por su conversación afable y por su siempre disponibilidad para enseñar.

Mi agradecimiento cierto también a M<sup>a</sup> Teresa Fernández, por su ayuda con las fotografías de microscopía óptica, y a Mari Carmen Moncada y a Toñi Huerta por su disposición de ayuda permanente, por su sincera amabilidad, y por la simpatía mutua que creo que nos hemos tenido.

Gracias a todos mis compañeros de Doctorado, a Asensio, por haberme traspasado su interés por la informática y por su simpatía, por los agradables momentos que pasamos conversando; a Raquel, por su generosidad; a Antonio, por su gentileza; a Fivos, a Verónica, a M<sup>a</sup> José, a Jose Ángel, a Marisa (postdoc) y a todos los demás. Gracias por este tiempo en que hemos coincidido.

Ya fuera del Departamento, también como soporte anímico necesario, gracias a Miguel Ángel G., a Sonia M., a Carmen M., a Julia T. y a Arancha U. por ser siempre presencia positiva en mi memoria y porque sé que siempre estarán ahí. Gracias también a mis compañeros de la XXXV promoción porque me apoyaron increíblemente cuando lo necesité.

Y gracias a mi madre y a mis abuelos que tanto han padecido (entre otras cosas) esta tesis.

Mi recuerdo a los gatos que fueron utilizados en este estudio experimental y gracias también a mi perrita Rodia que me ha enseñado a pensar más en ellos.

También quisiera agradecer al Ministerio de Educación y Cultura la Beca de Formación de Personal Investigador que he disfrutado entre los años 1997 y 2000, gracias a la cual he podido realizar esta tesis.

# **Índice**

## **I.INTRODUCCIÓN**

- 1.El ciclo vigilia-sueño. **2**
- 2.Naturaleza del sueño REM. **6**
- 3.Localización de las estructuras responsables del sueño REM. **8**
- 4.La porción ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) es una estructura clave de la red neuronal responsable de la generación y mantenimiento del sueño REM. **10**
- 5.El núcleo reticular magnocelular del bulbo raquídeo (RMc) estructura fundamental del control de la atonía producida durante el sueño REM. **12**
- 6.vRPO y atonía. **14**
- 7.Conexiones entre vRPO y RMc. **15**

## **II.PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

- 1.Planteamiento. **17**
- 2.Objetivos. **19**

## **III.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

- 1.Material
  - Casuística. **20**
  - Trazadores. **20**
  - Áreas bulbares inyectadas. **22**
- 2.Métodos
  - Procedimiento quirúrgico. **24**
  - Perfusión del animal. **26**
  - Procesamiento del cerebro. **27**
  - Estudio del material. **34**

## **IV.RESULTADOS**

- I.Lugares de inyección. **39**
- II.Conexiones entre el RMc y el vRPO
  - 1.Estudio de las neuronas marcadas retrógradamente
    - 1.1.Soma y dendrita proximal. **40**
    - 1.2.Dendrita del neuropilo. **45**

2.Estudio de las terminales marcadas anterógradamente	
2.1.Terminales marcadas localizadas sobre soma y dendrita proximal.	48
2.2.Terminales marcadas localizadas sobre las dendritas del neuropilo.	50
2.3.Relaciones establecidas entre terminales marcadas y no marcadas.	52
3.Análisis estadístico comparativo	
3.1.Diferencias en función de la localización de la terminal.	53
3.2.Diferencias en función de la estructura postsináptica.	53
3.3.Diferencias entre las terminales procedentes del RMc y las terminales de origen diverso localizadas sobre las neuronas marcadas.	53
3.4.Diferencias en función del tipo de contacto sináptico establecido.	54
3.5.Estudio de correlación entre diferentes características de los distintos grupos de terminales.	54
4.Resumen de las conexiones recíprocas establecidas entre el RMc y el vRPO.	54

## **V.DISCUSIÓN**

### **I.Consideraciones metodológicas. 56**

#### **II.Conexiones entre vRPO y RMc**

    1.Neuronas del vRPO que proyectan al RMc. 59

    2.Proyecciones del RMc hacia vRPO. 63

    3.Estudio comparativo. 66

#### **III.Significación funcional. 67**

## **VI.CONCLUSIONES. 71**

## **VII.BIBLIOGRAFÍA. 73**

## **VIII.ABREVIATURAS. 86**

## **IX.APÉNDICE ESTADÍSTICO. 87**



**I.**

# **Introducción**

## INTRODUCCIÓN

De igual modo que todos los seres vivos hemos de morir, todos los seres vivos tenemos fases de inactividad y de relativo aislamiento del exterior en nuestros ciclos vitales, el más elaborado de los cuales es el sueño. Conocemos, o al menos intuimos, que es durante la vigilia cuando efectuamos nuestros objetivos existenciales, pero no sabemos aún a ciencia cierta para qué sirve el sueño, que en el caso de los humanos representa alrededor de un tercio de nuestra biografía. Sin embargo, sí conocemos que el sueño es necesario para la vida y que no podemos prescindir de él ni aún para evitar riesgos que pudieran acabar con nuestra existencia. Los conocimientos que tenemos actualmente acerca del sueño complementan esa perspectiva pasiva e inerte del sueño con otros aspectos dinámicos que se establecen durante el mismo, ya que si bien en todo organismo vivo se establece un ciclo actividad-reposo, éste es distinto en los diferentes niveles de la escala filogenética. Es a partir de aves y mamíferos cuando el sueño adquiere una complejidad mayor, incorporando en el mismo una fase peculiar de muy especiales características, el sueño paradójico o sueño REM.

Sean cuales sean las funciones del sueño, a pesar de las diferencias ontogénicas, individuales y circunstanciales, nuestro período vigil está importantemente condicionado por el modo en que dormimos, por la calidad y la cantidad de nuestras fases de sueño.

Definido por Piéron, 1913, el sueño se caracteriza comportamentalmente por la ausencia de actividad con respecto a la vigilia, por ser reversible y periódicamente necesario, tener un ritmo relativamente independiente de las condiciones externas, y por la interrupción (que como luego se ha comprobado es incompleta) de las funciones sensitivas y motoras que unen el cerebro con el entorno, con el fuera de sí mismo. Una diferencia fundamental entre una vigilia fisiológica y el sueño es el nivel de enlace establecido con el exterior. Cuando la actividad del sistema nervioso central es la de sueño el umbral de estimulación para conseguir una respuesta aparece notablemente incrementado, de modo que las relaciones que se establecen en el sistema nervioso durante esta fase son, al parecer, esencialmente consigo mismo.

En cualquier caso, cuando hablamos de sueño hacemos referencia a un estado biológico periódico, complejo, heterogéneo, con una forma especial de actividad en el sistema nervioso central, cualitativamente distinto de la vigilia y necesario para la calidad de vida y cuyas distintas fases precisan de conexiones y mecanismos neuronales específicos para su establecimiento y coordinación.

## 1. El ciclo vigilia-sueño

En todos los seres vivos, como hemos señalado, incluyendo los organismos unicelulares, se establecen por tanto fases de actividad y de reposo, si bien el carácter de ese “descanso” es diferente en los distintos niveles de la escala evolutiva.

Con el descubrimiento efectuado por Berger (1929) de que las fases diferentes de actividad comportamental y de nivel de conciencia en humanos podían ser visualizadas mediante un registro externo de la actividad eléctrica cortical, se establecieron dos tipos fundamentales de patrones electroencefalográficos: el de la vigilia, caracterizado esencialmente por ondas de alta frecuencia y bajo voltaje, y el registro sincronizado del sueño, constituido éste por ondas lentas, de gran amplitud y baja frecuencia en el electroencefalograma.

Bremer (1935, 1936) afirmó que la desaferentización sensitiva completa, a excepción de los nervios ópticos y olfatorios, por una transección del tronco cerebral entre los dos colículos mesencefálicos, determina inmediatamente un estado funcional que se parece al del sueño natural y barbitúrico, afirmando que la vigilia se debía a impulsos estimuladores de origen sensorial que abordaban a través del tálamo la corteza cerebral. Llegó a estas conclusiones al comprobar que después de realizar secciones en el tronco del encéfalo de gatos a nivel intercolicular (cerebro aislado) se observaba una actividad eléctrica cortical permanente típica de sueño (ondas lentas), y que cuando las secciones se efectuaban en un nivel más caudal, concretamente entre bulbo y médula espinal, (preparación de encéfalo aislado), la respuesta electroencefalográfica era la de alternancia entre los ciclos de vigilia y sueño. Bremer (1935, 1936) defendió la hipótesis de que un flujo incesante de influencias sensoriales hacia la corteza cerebral mantenían su actividad vigil, citando sus palabras: “c’est a dire á un niveau d’activité neuronique, entretenu par un mécanisme réflexe continu, extéroceptif et proprioceptif”. La supresión de estas aferencias sensitivas darían lugar a una actividad eléctrica de sueño y al propio sueño. El sueño era por tanto un fenómeno pasivo consecuencia de la supresión de vigilia.

Ante esta teoría pasiva del sueño se levantaban los hallazgos de Hess (1954) que demostró que la estimulación eléctrica con baja frecuencia del tálamo medial y del prosencéfalo basal producían sueño. Nauta (1946) demostró en los laboratorios de Hess que las lesiones del prosencéfalo basal que se extendía al hipotálamo anterior provocaban un insomnio persistente en ratas. Estos hallazgos hacían pensar en una hipótesis activa del sueño que confirmaba los hallazgos de Von Economo (1929) que en pacientes con encefalitis letárgica describió dos grupos: 1) los pacientes con lesiones en hipotálamo posterior y tegmento mesencefálico dormían excesivamente, por lo que pensó que en esta zona se ubicaría un centro responsable de la vigilia, y 2) los pacientes con lesiones situadas principalmente en hipotálamo anterior y prosencéfalo basal permanecían insomnes, de modo

que en la zona anterior del hipotálamo debía situarse un centro hipnogénico, productor de sueño. En aquel momento sus teorías no fueron aceptadas debido a la naturaleza difusa de la lesión en la encefalitis letárgica.

Esta discusión pareció encontrar una respuesta definitiva en los hallazgos de Moruzzi y Magoun (1949) con la descripción del sistema reticular ascendente de activación. De acuerdo con estos autores, y las demostraciones sucesivas de sus laboratorios, de la vigilia era responsable la formación reticular del tronco del encéfalo que ocupaba el tegmento del tronco del encéfalo desde el bulbo al mesencéfalo extendiéndose al diencéfalo basal. Es la supresión de la vigilia por lesión o bloqueo de los impulsos reticulares ascendentes lo que produce un electroencefalograma sincronizado. El sueño aparecía pues como un estado pasivo como consecuencia de la supresión de estos impulsos reticulares ascendentes.

Experimentos posteriores de Batini y cols. (1959), Camacho-Evangelista y Reinoso-Suárez (1964), Sterman y Clemente (1962), Madoz y Reinoso-Suárez (1968), Zarranz y Reinoso-Suárez (1971) demostraron: 1) que había unas estructuras responsables de la vigilia que se encontraban situadas en el tegmento del puente rostral y del mesencéfalo extendiéndose al hipotálamo posterior y lateral, y 2) dos grupos de estructuras responsables del sueño con electroencefalograma sincronizado unas que estaban situadas en el hipotálamo anterior y prosencéfalo basal y otras caudales en puente caudal que se extendían a los núcleos cerebelosos (Reinoso-Suárez y de Andrés, 1976).

Hasta entonces podían por tanto identificarse dos fases principales en el ciclo vigilia-sueño: actividad cortical activada o vigil y sueño de ondas lentas. Este sueño es el que existe evolutivamente en reptiles, y que se define regularmente como sueño conductual, pero todavía habría de identificarse una nueva fase dentro del sueño: el sueño REM o sueño paradójico, que existe en los vertebrados homeotermos, es decir, en aves y mamíferos.

El sueño REM. Dentro de la visión principalmente pasiva del sueño, ya Macnish (1830, citado por Parkes, 1985) había distinguido un sueño completo y un sueño incompleto, en el que persistía alguna actividad mental, como la que había de existir durante los ensueños. Así quedaba planteadas dos formas distintas de sueño, pero fueron Aserinsky y Kleitman los que en 1953 caracterizaron en humanos una fase biológica peculiar específica distinta dentro del sueño, en la que existen de forma periódica movimientos oculares rápidos (distintos de los oscilantes lentos que ya habían sido descritos con anterioridad y que se producen durante el inicio del sueño), unidos a una activación del electroencefalograma similar a la que se produce durante la vigilia, acompañada de atonía. En 1958 Dement describió esta misma fase del sueño en gatos. Debido a la importante activación cortical que se produce durante esta fase del sueño Jouvet y Michel (1959) y Jouvet y col. (1959) le dieron el nombre de sueño paradójico (por esta misma causa también se le denomina desincronizado). A este tipo de sueño también se le denomina REM a consecuencia de los característicos movimientos

oculares rápidos (en inglés, “rapid eyes movements”) que se producen durante el mismo y que Dement y Kleitman (1957) asociaron con los ensueños.

El sueño REM existe en aves y mamíferos, de modo que a este sueño filogenéticamente “completo”, que incorpora esta etapa especial dentro del mismo, se le denomina sueño verdadero. En la organización del ciclo vigilia-sueño podemos diferenciar dos sistemas neurobiológicos principales, el de las complejas redes que generan activamente y mantienen las diferentes fases del ciclo vigilia-sueño, y el que establece el momento adecuado del sueño dentro del ciclo diario de 24 horas, el que establece el ritmo circadiano, representado por los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo. Alteraciones intrínsecas o extrínsecas en estos sistemas, pueden causar trastornos en la organización del ritmo vigilia-sueño.

Caracterización de las diferentes fases del ciclo. Antes de describir las estructuras del sistema nervioso central que se ha demostrado son formaciones nodales de las redes neuronales responsables de la vigilia y de las diferentes fases del sueño, expondremos brevemente los registros poligráficos de las actividades bioeléctricas de que nos valemos para caracterizar esas fases. Estos parámetros son muy útiles ya que no son invasivos, y en el propio hombre se realizan por medio de registros externos. Es verdad que existen muchas más variables directamente relacionadas con las diferentes fases del ciclo vigilia-sueño, ya que tanto el sueño como la vigilia suponen modificaciones funcionales del individuo como un todo, y, en consecuencia, en casi todos los sistemas fisiológicos se manifiestan estas modificaciones: existen cambios en funciones endocrinas, en la actividad del sistema nervioso autónomo, en las funciones cardíaca y respiratoria, y en la función termorreguladora, entre otras.

Conviene recordar en primer término que se han realizado clasificaciones de las etapas del sueño basadas en criterios polisomnográficos con objeto de permitir una interpretación homogénea de los mismos. En humanos se utiliza la clasificación de Rechtschaffen y Kales (1968) mientras que en gatos se utiliza la de Ursin y Sterman (1981).

El nivel de actividad cortical es el que nos da la pauta primera para establecer el momento del ciclo vigilia-sueño en que nos encontramos: durante la vigilia, el registro es de ondas de bajo voltaje y alta frecuencia (EEG activado), en que suele predominar el ritmo  $\beta$  (ondas de más de 13 ciclos por segundo) cuando el individuo tiene los ojos abiertos; situándose las ondas dentro de la banda de frecuencias  $\alpha$  (de 8 a 12 Hz), cuando el sujeto se encuentra en reposo con los ojos cerrados. El EMG registra en esta fase un modo de actividad muscular tónico.

Durante el sueño no-REM encontramos cuatro fases diferentes representando un progresivo enlentecimiento en el registro de actividad cortical con una creciente profundización en el sueño, entendida ésta como la necesidad de un estímulo externo

progresivamente más intenso para que el nivel de actividad del sistema nervioso central vuelva a ser el de vigilia.

El sueño REM viene caracterizado por un EEG activado, (similar al registrado durante la fase 1 en humanos, o al existente durante la vigilia en algunos animales), y por un EMG en que aparece una total ausencia de tono muscular (atonía), si bien de forma fásica pueden presentarse breves sacudidas musculares. Además aparecen en el EOG de forma intermitente (fásica) los característicos movimientos oculares rápidos, (que permitieron identificar y que dan nombre a esta fase del ciclo vigilia-sueño), aislados o agrupados en salvas, que acontecen de un modo simétrico en los dos ojos y cuya orientación puede ser horizontal, vertical u oblicua, si bien predominan los movimientos horizontales. En animales de experimentación es obligado para caracterizar esta fase observar las puntas ponto-genículo-occipitales, las PGOs, lo que normalmente se hace en el núcleo geniculado lateral.

Arquitectura del sueño. Las diferentes fases del sueño no se producen de forma arbitraria y desorganizada, sino que existe una evolución del mismo durante la noche, configurando lo que se suele denominar la arquitectura del sueño. La arquitectura del sueño está condicionada, entre otros factores, por la dependencia de la cantidad y la calidad de sueño que se haya tenido previamente, pero durante una noche de sueño típica, en un individuo adulto, el sueño se inicia desde el estadio 1, (de somnolencia), del sueño no-REM. (de modo que en condiciones fisiológicas en el cerebro maduro el sueño REM sigue siempre al sueño no-REM), para pasar posteriormente de forma progresiva por las fases 2, 3 y 4 (con un enlentecimiento progresivo por tanto de la actividad del electroencefalograma cortical), después de lo cual y generalmente después de un paso por el estadio 2 se inicia finalmente el sueño REM aproximadamente a los 90 minutos después del inicio del sueño. De este modo, en circunstancias fisiológicas el sueño se organiza cíclicamente, alternándose las fases de sueño REM con las de sueño de ondas lentas en ciclos de aproximadamente 90 minutos.

Estos ciclos se repiten de 4 a 6 veces cada noche, pero su carácter va variando a lo largo de la misma, así, los estadios 3 y 4 (sueño delta o de ondas lentas) suelen concentrarse en las primeras horas de la noche, mientras que, inversamente, las fases de sueño REM, relativamente cortas en el inicio del sueño, se van prolongando progresivamente en los sucesivos ciclos: después del primer REM los intervalos entre sucesivos episodios REM disminuyen, mientras que su duración aumenta.

La profundidad del sueño, definiendo a ésta por el nivel de intensidad de estímulo necesaria para que el sistema nervioso central se incorpore a su modo de actividad de la fase vigil, varía también con las distintas etapas del sueño siendo ésta generalmente progresiva a medida que avanzamos en el ciclo de sueño, de este modo en gatos la etapa más profunda corresponde a la del sueño REM aunque en humanos la fase más profunda de sueño es la fase 4 no-REM. A pesar del relativo aislamiento del exterior que se produce durante el sueño, éste no es completo, sino que sigue manteniéndose una aferencia de estímulos



externos y un determinado nivel de atención, de modo que no sólo la intensidad, sino también el carácter del estímulo son importantes a la hora de comenzar una nueva fase de vigilia, pudiendo recibirse estímulos que no llegan a despertar al individuo, como indican los estudios con potenciales evocados.

Estructuras cerebrales y sueño. Se conocen gran número de las estructuras que componen las complejas redes neuronales responsables del sueño y de la vigilia, y las estructuras responsables de los distintos mecanismos de estas manifestaciones comportamentales parecen ser semejantes en la mayoría de los mamíferos que han sido estudiados. El sistema reticular ascendente de activación, constituido por la formación reticular ponto-mesodiencefálica es el área cerebral encargada del mantenimiento de la vigilia, a la que debemos agregar el núcleo basal magnocelular en el prosencéfalo basal. Los neurotransmisores implicados serían: en prosencéfalo basal la acetilcolina, en hipotálamo posterior y lateral la histamina y el glutamato, en el área tegmental ventral y en la sustancia negra la dopamina, y en el tegmento pontomesencefálico participarían la acetilcolina (núcleos pedúnculopontino y láterodorsal del tegmento pontino), la serotonina (núcleos del rafe), la noradrenalina (locus coeruleus) y el glutamato.

Como estructuras responsables del sueño no-REM podemos diferenciar esencialmente un sistema hipnogénico rostral, constituido por la región preóptica y el hipotálamo anterior, a los que debemos añadir la corteza cerebral, principalmente prefrontal y los núcleos talámicos reticular y dorsomedial, y un sistema de inducción de sueño caudal constituido por tegmento pontino caudal extendiéndose al núcleo del tracto solitario, a los que debemos añadir los núcleos profundos del cerebelo. Los principales neurotransmisores implicados son GABA, glutamato y adenosina.

Con respecto a la red neuronal responsable del sueño REM trataremos en el apartado siguiente.

## **2. Naturaleza del sueño REM**

Además de las manifestaciones bioeléctricas señaladas más arriba durante el sueño REM se dan otros fenómenos como son un aumento de la actividad simpática y parasimpática durante el sueño REM fásico (y un relativo incremento de la actividad parasimpática durante el REM tónico), con una vasoconstricción generalizada, que puede ser responsable del incremento de la presión arterial que se produce durante esta fase, un aumento del consumo de oxígeno y una respiración irregular con un aumento de la resistencia de las vías aéreas superiores como consecuencia de la atonía, irregularidades también en la frecuencia cardíaca, y una pérdida de la capacidad termorregulatoria. Se ha demostrado igualmente un aumento del flujo sanguíneo en amplias regiones cerebrales: tegmento protuberancial oral, tálamo,

prosencéfalo basal, amígdala y áreas corticales paralímbicas y sensoriales unimodales (Braun y col., 1997).

También los sueños suelen producirse más frecuentemente durante esta fase del ciclo vigilia-sueño. Cuando se despierta al individuo en la fase no-REM puede referir en ocasiones que estaba soñando, pero el porcentaje de situaciones en que ésto acontece es inferior al que se produce cuando se despierta al individuo durante la fase de sueño REM, y la viveza y los detalles que de éstos se recuerdan es mucho más pobre que la de los producidos durante el sueño REM (Parkes, 1985; Czeisler y Richardson, 1998). Es igualmente interesante destacar, que la incidencia del recuerdo de lo soñado durante el sueño no-REM puede aumentar tras una privación selectiva de sueño REM (Czeisler y Richardson, 1998). Pero no todos los sueños que se producen durante esta fase son similares, sino que su complejidad onírica y riqueza emocional van incrementándose a lo largo de la noche, paralelamente a la mayor duración de esta fase del sueño. Como se indicó previamente los movimientos oculares rápidos que se producen durante el sueño REM han sido asociados a los ensueños, pero no parece que consistan en mero seguimiento visual de la acción que se produce durante los mismos, sino que probablemente se deba a la implicación de mecanismos neuronales parcialmente coincidentes.

A pesar de esta “paradójica” actividad durante el sueño REM, hemos de recordar que éste se produce en el mismo cerebro que existía durante la vigilia, de hecho, al igual que él e independientemente, se ve afectado por diferentes parámetros individuales como son la edad y la personalidad, y por parámetros externos como son la dieta (relación ya establecida por Brillat-Savarin en 1841), el entorno y otros. También existen diferencias en el sueño REM de las diferentes especies. Pasamos a continuación a referir estas diferencias individuales, ontogenéticas y filogenéticas.

Del mismo modo que existen diferencias en el número de horas totales que necesita dormir una persona, existen diferencias en los porcentajes de sueño REM que cada individuo necesita durante el mismo, si bien en el adulto suele oscilar entre un 20 y un 25% del tiempo total de sueño. Entre los factores más importantes que condicionan el modo de sueño está la edad: en el neonato el sueño representa 2/3 de su vida, y está organizado con un ritmo ultradiano; en el adulto el sueño ocupa 1/3 del día y el ritmo es generalmente circadiano. Las fases 3 y 4 del sueño no-REM disminuyen en duración a lo largo de la vida del individuo, sin embargo, la proporción de sueño REM permanece estable, representando siempre entre un 20 a un 25% del tiempo total de sueño desde los 3-5 años. La necesidad de sueño REM aparece ya intraútero representando un 80% del tiempo total de sueño en niños nacidos 10 semanas prematuramente. En el recién nacido a término puede superar el 50% del sueño total.

La proporción de sueño REM y no-REM (y por tanto la necesidad de sueño REM) varía ampliamente entre especies, estando el patrón de sueño condicionado por el patrón de



actividad de cada animal. También existen diferencias entre el sueño REM de pequeños y grandes mamíferos, y existen adaptaciones especiales en animales acuáticos. A pesar de esto, el porcentaje de sueño REM en muchos animales es similar al del hombre, si bien por ejemplo las sacudidas mioclónicas fásicas que ocurren durante el sueño REM son más frecuentes y violentas en algunas especies.

Con respecto a la función que pudiera tener el sueño REM, se le asigna un papel importante en la maduración y desarrollo de los circuitos corticales debido, entre otras razones, a la alta proporción que, como se ha indicado, representa este tipo de sueño en el cerebro inmaduro. Hoy día se le atribuye un importante papel en los procesos de aprendizaje y memoria (Reinoso-Suárez, 1998; Reinoso-Suárez y col., 1999).

### **3. Localización de las estructuras responsables del sueño REM**

Diferentes tipos de experimentos han intentado localizar las estructuras responsables del sueño REM y de sus distintas manifestaciones. Los experimentos de abordaje para su localización incluyen transecciones, lesiones, estimulaciones mediante microinyección de neurotransmisores y registros eléctricos de la actividad unitaria, como describimos a continuación.

Mediante estudios de transección del tronco cerebral (Jouvet, 1962; Siegel y col., 1984), de estudio electrofisiológico en casos de privación selectiva de sueño paradójico (Jouvet y col., 1964) y de lesiones parciales de la formación reticular del puente (Carli y Zanchetti, 1965) se llegó a localizar en protuberancia la específica base neuronal para la génesis del sueño REM en gato. Por otro lado Camacho-Evangelista y Reinoso-Suárez (1964) localizaron en el tegmento pontino oral unas estructuras cuya estimulación inducía activación del electroencefalograma, puesto que su lesión provocaba fenómenos de sincronización en el mismo. Estudios posteriores de Baghdoyan y col., 1984 y 1987, demostraron que al menos las inyecciones de carbamilcolina (carbacol, un agonista colinérgico que actúa simultáneamente sobre receptores nicotínicos y muscarínicos, por lo que en esta zona habrían de existir neuronas colinoceptivas), efectuadas en tegmento pontino del gato inducían sueño desincronizado. También en el área reticular tegmental gigantocelular pontina inyecciones de carbacol inducían episodios de sueño paradójico (Silberman y col., 1980).

También en humanos se han descrito lesiones en el tegmento pontino que reducían o eliminaban completamente el sueño REM (Chase y col., 1968; Feldman, 1971; Cummings y Greenberg, 1977).

En resumen en el tegmento protuberancial se han descrito estructuras a las que se les ha atribuido un papel importante en las diferentes manifestaciones que caracterizan al sueño REM por lo que haremos una breve descripción de esta zona del tronco del encéfalo.

El puente o protuberancia es la región del tronco del encéfalo limitada en su porción rostral por el mesencéfalo y en su porción caudal por el bulbo raquídeo. Anatómicamente podemos dividirlo (para descripción en detalle ver Parent, 1996) en una porción ventral y una parte dorsal. La porción ventral está formada por los núcleos del puente y por fibras transversales (pontocerebelosas), longitudinales (córticopónticas, córticobulbares y córticoespinales) y en su parte caudal por el complejo olivar superior y las fibras del cuerpo trapezoide. La parte dorsal está constituida por el denominado tegmento pontino, donde se ubican la formación reticular pontina, vías ascendentes y descendentes y los núcleos de los nervios craneales. La formación reticular pontina en el tegmento protuberancial representa una continuación de la formación reticular situada rostral y caudalmente. En ella se han descrito dos núcleos: el núcleo reticular oral del puente y núcleo reticular caudal del puente. En la porción rostral del tegmento pontino encontramos dorsales al núcleo reticular oral del puente, entre otras estructuras, el locus coeruleus (agrupación irregular de células pigmentadas próxima a la sustancia gris periventricular de la parte superior del suelo del cuarto ventrículo) ocupado fundamentalmente por células noradrenérgicas que también se encuentran en los núcleos próximos subcoeruleus, coeruleus  $\alpha$  y peri-coeruleus  $\alpha$ . En los dos últimos mezcladas en su parte anterior con células colinérgicas que se extienden dorsal y rostralmente a los núcleos laterodorsal tegmental y pedúnculo pontino. Ocupando la línea media a este nivel rostral del tegmento pontino se encuentran los núcleos central superior y dorsal del rafe ocupados principalmente por células serotoninérgicas, que se encuentran también lateralmente en otras formaciones del tegmento pontino.

Recordemos que el término de formación reticular hace referencia esencialmente a regiones centrales del tegmento del tronco del encéfalo, caracterizadas en su visualización mediante técnicas de mielina por una compleja red de fibras (que se disponen en distintas orientaciones entrecruzándose unas con otras) entre las que se encuentran embebidas agrupaciones heterogéneas de células dispersas de variados tipos y tamaños. Con respecto a las funciones que desempeña, desde los trabajos de Ramón y Cajal, (1904,1909), fue considerado como un sistema de asociación sensitivo motor. Posteriores experimentos de Magoun (1944) demostraron las funciones motoras de la formación reticular, y más tarde Moruzzi y Magoun (1949) describieron desde la misma impulsos ascendentes que provocaban la reacción de despertar. Sucesivos estudios citoarquitectónicos y de otros tipos permitieron, primero, independizar determinadas agrupaciones celulares dentro de la formación reticular, (si bien en modo alguno independientes dada la innumerable cantidad de fibras de conexión interna), para posteriormente describir sus diferentes conexiones aferentes y eferentes y, consecuentemente, sus diferentes funciones.

En el estudio realizado por Meessen y Olszewski (1949) en tronco del encéfalo de conejo (posteriormente también en humanos, Olszewski y Baxter, 1954), fue caracterizada por vez primera el núcleo reticular oral del puente, si bien la primera descripción citoarquitectónica en

gato se debe a Taber (1961) que le llamó nucleus pontis centralis oralis. El núcleo reticular oral del puente se extiende rostrocaudalmente desde la decusación del brachium conjunctivum hasta un nivel rostral del núcleo motor del trigémino, mientras que el caudal ocupa la región tegmental pontina situada entre este nivel y un nivel medio del núcleo praepositus hypoglossi: caudalmente se continúa con el núcleo reticular gigantocelular del bulbo raquídeo.

#### **4. La porción ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) es una estructura clave de la red neuronal responsable de la generación y mantenimiento del sueño REM**

Por medio de lesiones, estimulación eléctrica y química y registro de unidades de han podido identificar en el tronco del encéfalo las estructuras que son responsables de los diferentes eventos que caracterizan el sueño REM: atonía, activación del electroencefalograma (EEG), movimientos rápidos de los ojos, y PGOs (Jouvet, 1979; Jones, 1990; Steriade y McCarley, 1990; Reinoso-Suárez, 1998). Estas estructuras pueden resumirse diciendo que de la atonía son responsables el tegmento pontino dorsolateral y el núcleo reticular bulbar magnocelular; de la activación del EEG el núcleo pedunculopontino y la formación reticular pontomesencefálica; de las PGOs las neuronas colinérgicas mesopontinas; y de los movimientos rápidos de los ojos la formación reticular mediopontina, el núcleo paraabducens y el núcleo praepositus hypoglossi (para más detalles ver Reinoso-Suárez, 1998; Reinoso-Suárez y col., 1999, 2001). Sin embargo quedaba por demostrar qué estructura era la responsable de que todas estas manifestaciones se dieran simultánea y armónicamente como ocurre en el sueño REM.

Roussel (1967), Roussel y col. (1967) y Jouvet (1972) mediante estudios de lesión efectuadas en locus coeruleus que provocaban una casi completa ausencia de sueño REM, consideraron este núcleo como el responsable de esta fase del sueño. Sin embargo estudios de Jones y col. (1977) mostraron que lesiones pequeñas localizadas en el locus coeruleus tenían poco efecto en el sueño REM, que reaparecía en 48 horas después de la lesión y recuperaba sus niveles normales en dos semanas (por ello los autores deducen que estas neuronas no son necesarias para el mismo, aunque podrían estar implicadas en la modulación de su actividad fásica). También los experimentos de De Andrés y col. (1985) mostraron que la lesión selectiva del locus coeruleus  $\alpha$  y peri-locus coeruleus  $\alpha$  dan lugar a un aumento del sueño REM. Igualmente la estimulación eléctrica del área del locus coeruleus induce vigilia, pero no un incremento significativo en el sueño REM (Frederickson y Hobson, 1970).

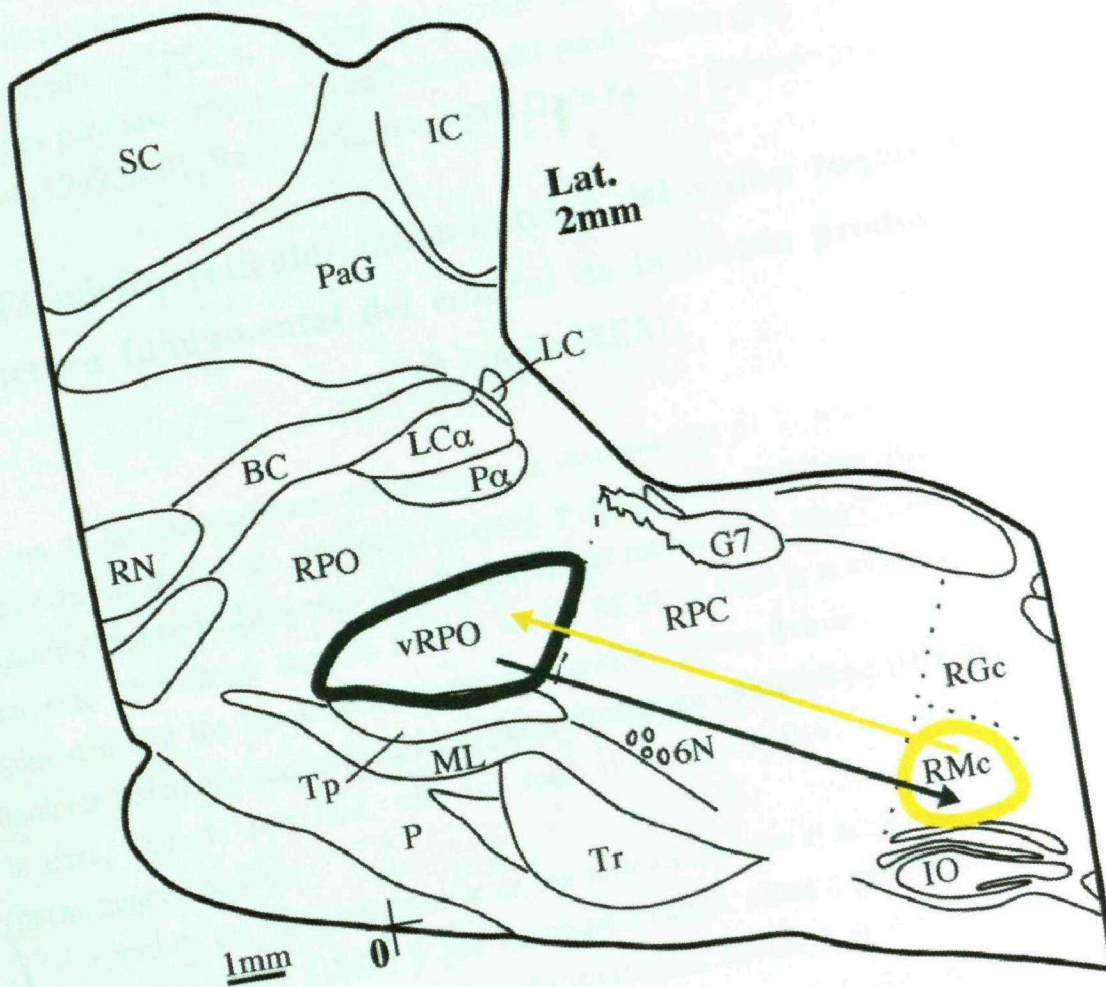
La zona del tegmento responsable del sueño REM fue identificada (mediante la inyección del agonista colinérgico carbacol) por diversos autores (Vanni-Mercier y col., 1989;

Quattrochi y col., 1989 y Yamamoto y col., 1990) como ubicada dorsolateralmente en el tegmento pontino oral, concretamente en el locus coeruleus  $\alpha$  y peri-locus coeruleus  $\alpha$  de Sakai (1988). Sin embargo, un trabajo de George y col., 1964, demostraba que era la estimulación muscarínica del núcleo pontino reticular oral provocaba atonía y las demás manifestaciones del sueño REM, incluso desde un estado original de vigilia en el animal, un cuadro que revertía mediante la administración de fármacos anticolinérgicos. La estimulación eléctrica del tegmento pontino provocaba una disminución en la latencia de sueño REM y un incremento en el tiempo total de sueño REM (Frederickson y Hobson, 1970). Otra serie de estudios ponían en duda que fuera la región dorsolateral del tegmento pontino oral la inductora de sueño REM: Jones (1979) indicaba que era la lesión en la zona adyacente del área gigantocelular tegmental pontina la que provocaba la eliminación completa del sueño REM; inyecciones de agonistas colinérgicos en el locus coeruleus y subcoeruleus no producían un verdadero sueño REM, sino algunas de sus manifestaciones con presencia de vigilia (Mitler y Dement, 1974; Van Dongen y col., 1978; Hayes y col., 1984 y Katayama y col., 1984); y otros experimentos demostraban que mientras las lesiones en la porción ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) provocaban un significativo descenso en el sueño REM (Gutiérrez-Rivas y col., 1978 y De Andrés y col., 1985) las lesiones dorsolaterales en el área del complejo del locus coeruleus producían aumento del mismo (De Andrés y col., 1985).

Todo ello indujo al grupo de investigaciones del sueño del Departamento de Morfología de la Universidad Autónoma de Madrid a hacer un estudio minucioso de la respuesta de todo el tegmento pontino oral y caudal a la estimulación colinérgica. Para poder precisar el lugar de la inyección localizaron sólo un sitio en cada hemisferio de cada animal, inyectaron cantidades muy pequeñas (20nl) en cada caso y en la mayor parte de los animales en la última microinyección inyectaron junto con el agente colinérgico una solución de peroxidasa que permitió además de precisar el lugar de la inyección el estudio de sus conexiones. Así pudieron demostrar que son sólo las microinyecciones localizadas en la parte ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) las que, independientemente de la dosis utilizada, producen, con corta latencia, un dramático y prolongado incremento en el sueño REM con todas sus manifestaciones bioeléctricas y comportamentales (Rodrigo-Angulo y col., 1989; Reinoso-Suárez y col., 1990 y 1994, y Garzón y col., 1998), y que la actividad eléctrica neocortical y del hipocampo de este sueño REM es similar a la producida durante el sueño REM fisiológico (Garzón y col., 1997). Estudios posteriores de registros unitarios, conexiones, estimulación eléctrica y química permiten afirmar que el vRPO es el lugar nodal, que actúa a manera de un director de orquesta de la extensa red neuronal que genera armónicamente y mantiene el sueño REM (Reinoso-Suárez, 1998; Reinoso-Suárez y col., 1999, 2001).

**Figura 1.** Representación de la localización de los núcleos cuyas conexiones hemos estudiado, vRPO y RMc, dentro de la formación reticular del tronco del encéfalo en un dibujo de un corte sagital esquemático del mismo a 2mm de la línea media.





El vRPO (Fig. 1) se encuentra en el gato entre las coordenadas, de acuerdo con el atlas de Reinoso-Suárez (1961): ánteroposterior de 0,5 a -3,5 mm; lateral de 0.5 a 3.5 y vertical de 3,5 a 5,0 mm (Garzón y col., 1998; Reinoso-Suárez y col., 1999, 2001). Tiene conexiones recíprocas (Reinoso-Suárez y col., 1994) con las estructuras nerviosas que juegan un papel esencial en la organización de las otras fases del ciclo vigilia-sueño: vigilia, sueño ligero y sueño de ondas lentas; estas conexiones establecen el sustrato anatómico necesario para la interacción entre estas estructuras y organizar secuencialmente las diferentes fases del ciclo. El vRPO también establece conexiones recíprocas con cada uno de los núcleos responsables de las distintas manifestaciones del sueño REM: activación del EEG, atonía, movimientos oculares rápidos y PGOs, lo que le permite estimular simultáneamente todas estas formaciones para una armónica manifestación del sueño REM (Fig. 2) (Reinoso-Suárez y col., 1994, 1999, 2001; Reinoso-Suárez, 1998; De la Roza y Reinoso-Suárez, 2000).

## **5. El núcleo reticular magnocelular del bulbo raquídeo (RMc) estructura fundamental del control de la atonía producida durante el sueño REM**

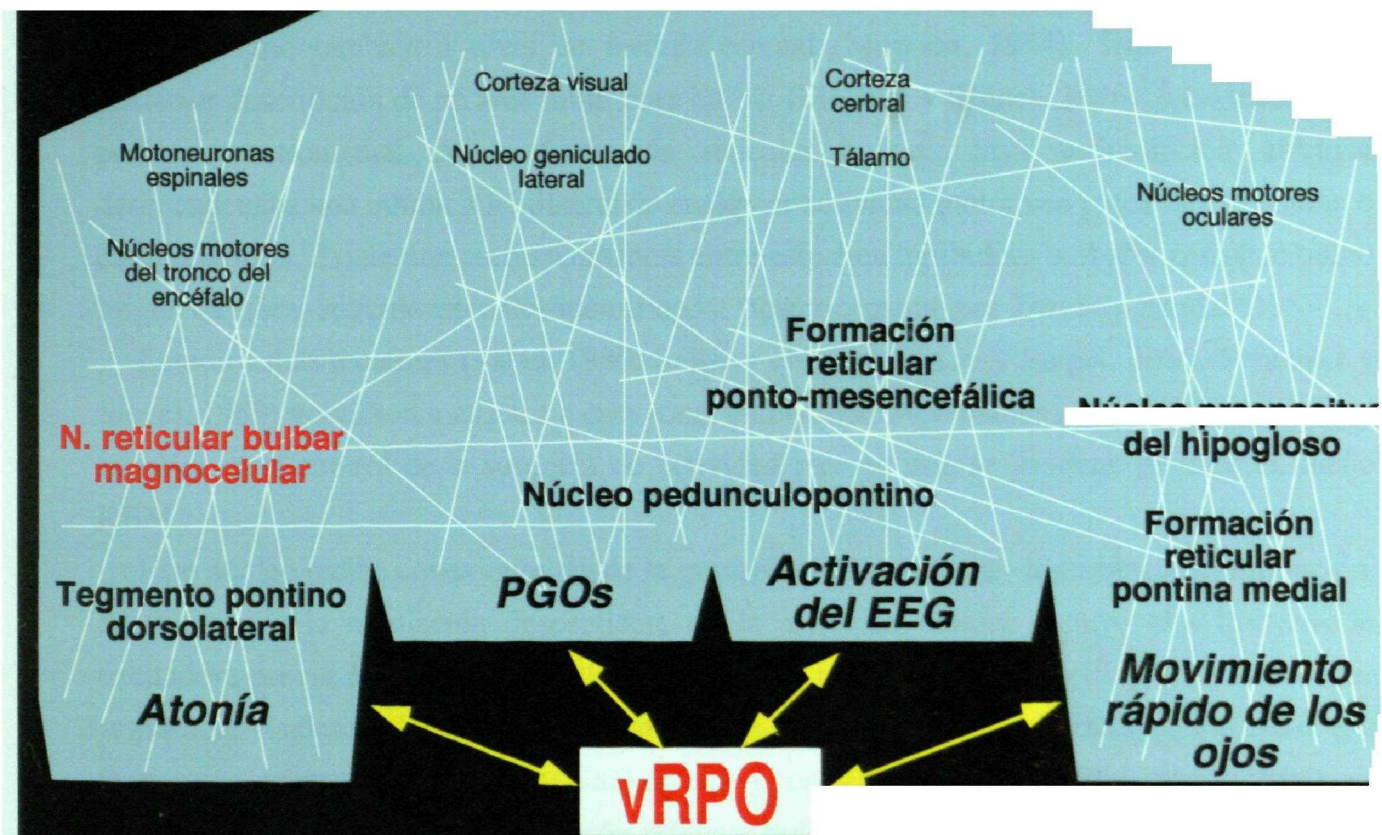
Una de las características del sueño es la disminución de la actividad muscular, que se convierte en atonía de músculos flexores y extensores (parálisis flácida no recíproca), durante el sueño REM, como uno de sus rasgos esenciales e identificatorios. Atonía que se mantiene tónicamente durante todo el sueño REM, si bien a intervalos, que normalmente coinciden con los movimientos oculares rápidos, existen breves espasmos musculares de carácter fásico que suelen producirse generalmente en músculos periféricos como los dedos o la cara. Durante esta fase, sólo los músculos respiratorios, oculares y del oído medio permanecen activos.

La pérdida del tono muscular y de los reflejos durante el sueño fue descrito por primera vez por Rosenbach (1881) y por Lombard (1888), citados por Parkes, 1985. Durante el sueño REM se le atribuye una función protectora, debido a la alta actividad que presenta el córtex cerebral (incluyendo la corteza motora) durante esta fase del sueño por lo que es necesaria esta inhibición del brazo ejecutor final del movimiento con objeto de evitar, por ejemplo, la representación motora de los ensueños, recordemos que especialmente elaborados durante esta fase.

En estudios experimentales se vio que la parálisis que ocurre durante el sueño REM puede ser selectivamente eliminada mediante lesiones dorsales en el tegmento pontino, (Jouvet et Delorme, 1965; Jones y col., 1977; Sakai, 1980; Hendricks y col., 1982), y también mediante lesiones en bulbo medial (concretamente en RMc, Schenkel y Siegel, 1989). Hendricks y col., en 1982 y Morrison, en 1988, demostraron que los patrones de conducta

**Figura 2.** Representación de la orquesta neuronal responsable de las manifestaciones bioeléctricas que definen el sueño REM: atonía, PGOs, activación del EEG y movimientos oculares rápidos. El director de esa orquesta neuronal es el vRPO, que está conectado bidireccionalmente con las estructuras directamente responsables de las mismas (en negrita en la figura). El núcleo reticular bulbar magnocelular (en rojo) es el último responsable encefálico de la atonía del sueño REM.





El sistema de control de los movimientos oculares es un sistema complejo que involucra a varias áreas del cerebro. El núcleo geniculado lateral (NGL) es una estructura clave que recibe información de la corteza visual y la transmite a la corteza cerebral. El tálamo también juega un papel importante en la integración de la información sensorial. El núcleo pedunculopontino (NPP) y el núcleo prepositivo del hipogloso (NPH) son estructuras que participan en la generación de los movimientos oculares. El tegmento pontino dorsolateral (TPD) es una estructura que se encuentra en el tronco del encéfalo y que está involucrada en la regulación de la actividad de los motoneuronas espinales. El núcleo reticular bulbar magnocelular (NRBM) es una estructura que se encuentra en el tronco del encéfalo y que está involucrada en la regulación de la actividad de los motoneuronas espinales. El núcleo reticular ponto-mesencefálico (NRPM) es una estructura que se encuentra en el tronco del encéfalo y que está involucrada en la regulación de la actividad de los motoneuronas espinales. El núcleo reticular pontina medial (NRPMe) es una estructura que se encuentra en el tronco del encéfalo y que está involucrada en la regulación de la actividad de los motoneuronas espinales. El núcleo reticular bulbar magnocelular (NRBM) es una estructura que se encuentra en el tronco del encéfalo y que está involucrada en la regulación de la actividad de los motoneuronas espinales. El núcleo reticular ponto-mesencefálico (NRPM) es una estructura que se encuentra en el tronco del encéfalo y que está involucrada en la regulación de la actividad de los motoneuronas espinales. El núcleo reticular pontina medial (NRPMe) es una estructura que se encuentra en el tronco del encéfalo y que está involucrada en la regulación de la actividad de los motoneuronas espinales.

motora producidos durante el sueño REM sin atonía dependen de la extensión y del lugar exacto del tronco del encéfalo en que se efectúen las lesiones, existiendo por tanto diferentes zonas que pueden provocar este estado. También en humanos se ha demostrado que cuando las estructuras inhibitorias del tono fallan, el individuo se mueve acorde con la actividad de la corteza motora (Schenk y col., 1987).

El primero en otorgar una función motora a las neuronas reticulares, como se ha indicado previamente, fue Magoun (1944), y lo que le llevó a investigar esta posibilidad fue el hecho de que los hallazgos patológicos en la poliomielitis no estaban tanto en los núcleos motores como en la parte baja del tronco del encéfalo. La estimulación eléctrica en esta zona llevó a identificar su papel en la regulación de la actividad de neuronas motoras no sólo de los pares craneales sino también a nivel de médula espinal (Magoun, 1944). Ésto condujo a la posterior descripción de un área inhibidora bulbar (Magoun y Rhines, 1946), localizada en la porción ventromedial de la formación reticular bulbar, cuya estimulación eléctrica desencadenaba una inhibición bilateral de cualquier actividad motora en gatos anestesiados o descerebrados. Existe una correspondencia entre este área inhibidora bulbar y zonas de bulbo origen de fibras retículoespinales identificadas posteriormente por Torvik y Brodal (1957).

Estudios más recientes (Sakai, 1980; Sakai y col., 1981; Lai y Siegel, 1988; Schenkel y Siegel, 1989) volvieron a atribuir a esta zona, incluyendo importantemente al RMc, un papel esencial en el control de la ausencia de actividad motora que se produce durante el sueño REM.

Este núcleo recibe conexiones desde la protuberancia, como se describirá a continuación, de modo que la regulación descendente de la actividad motora incluye una transmisión excitadora previa hasta esta zona de la formación reticular bulbar medial. El trayecto que seguiría la vía descendente de inhibición motora desde bulbo hacia médula espinal sería por la porción ventrolateral de ésta (Jankowska y col., 1968). Van Gehuchten (1903) ya evidenció conexiones desde formación reticular bulbar a médula espinal en conejo mediante técnicas de degeneración retrógrada. Posteriores experimentos de Pitts (1940) y de Torvik y Brodal (1957) vinieron a confirmar estos resultados. En las representaciones de cortes transversales de tronco del encéfalo de gato mostrando las células que habían degenerado retrógradamente después de hemisecciones medulares a nivel cervical, se ve claramente la importante afectación del núcleo reticular magnocelular del bulbo raquídeo, de forma bilateral pero principalmente ipsilateral a la lesión. También es de destacar que en este trabajo se describen en este núcleo neuronas degeneradas tanto gigantes como otras de tamaños más pequeños. El trayecto que siguen en médula espinal los axones retículoespinales originados en bulbo forman un tracto lateral en el funículo ventrolateral ipsilateral y en menor extensión contralateral, a diferencia de los que se originan directamente desde puente, que forman un tracto medial en el funículo ventromedial ipsilateral. Pitts (1940), Bodian (1946) y Torvik y Brodal (1957) establecieron que sólo cuando se afectaba el funículo ventrolateral de la



médula espinal existía una importante degeneración retrógrada en la formación reticular bulbar. Bodian (1946) y Torvik y Brodal (1957) determinaron también en estos experimentos el nivel más caudal de las hemisecciones espinales que producían cambios retrógrados en la formación reticular, concluyendo que las fibras retículoespinales no alcanzaban segmentos lumbares, si bien hay que tener en cuenta la baja sensibilidad de la técnica de degeneración retrógrada.

La atonía que se registra en el electromiograma durante esta fase se debe principalmente a una hiperpolarización de las motoneuronas espinales extensoras y flexoras (Fung y col., 1982; Chase y Morales, 1983 y Chase y col., 1986) inducida por fenómenos de inhibición postsináptica (Llinas y Terzuolo, 1964 y 1965, y Chase y col., 1986), inducida por una activación tónica de un mecanismo inhibitorio bulboespinal (Pompeiano, 1975).

La regulación de la atonía a través de la proyección descendente desde RMc hacia motoneuronas de la médula espinal es extraordinariamente precisa. No podemos en absoluto descartar, además, que algunos de estos impulsos pudieran estar interrelacionados con otras vías descendentes como son las del control respiratorio, ni la posibilidad (Rossi y Zanchetti, 1957) de que las proyecciones desde el área bulbar inhibidora hacia las motoneuronas de médula espinal desencadenen en ésta patrones de actividad altamente organizados de un modo relativamente independiente.

## 6. vRPO y atonía

Con respecto al importante papel que también juega la porción ventral del núcleo reticular oral del puente en el control de la atonía, hemos de recordar los experimentos de Hendricks y col. (1982), y de Morrison (1988) en los que si bien lesiones en la región dorsolateral del tegmento pontino rostral oral provocaban en gatos la aparición de sueño REM sin atonía, para que se desencadenaran fenómenos complejos de actividad motora durante esta fase eran necesarias lesiones más extensas hacia porciones protuberanciales situadas más ventralmente. En el trabajo de Jones (1979) tras lesiones en el campo gigantocelular tegmento pontino, (que incluye la porción ventral del núcleo reticular oral del puente y no el tegmento pontino dorsolateral), se evidenciaba también una consecuente ausencia de la atonía muscular típica del sueño REM. Se demostró que se produce atonía durante el sueño REM tras estimulación eléctrica del RPO (Fung y col., 1982), también se produce atonía en el gato descerebrado tras el mismo tipo de estimulación en la zona (Lai y Siegel, 1990), y la estimulación química con carbacol del RPO induce igualmente atonía (Takakusaki y col., 1993).

Además en esta zona existen células que se despolarizan por acción del glutamato (Núñez y col., 1998), y es posible igualmente inducir atonía tras estimulación glutamatérgica del vRPO (Garzón y col., 1996), de modo que en el vRPO existen neuronas con receptores

glutamatérgicos y colinérgicos que pueden inducir la atonía del sueño REM. Sin embargo, mientras que inyecciones de carbacol en la formación reticular bulbar no inducen atonía (Baghdoyan y col., 1984; Takakusaki y col., 1993), la inyección de glutamato en RMc (Lai y Siegel, 1988) sí lo hace, y se ha demostrado un aumento de la liberación de glutamato en RMc durante el sueño REM (Kodama y col., 1998) así como las proyecciones a RMc desde células glutamatérgicas del vRPO (Lai y col., 1999). Estos datos inducen a pensar que serían neuronas glutamatérgicas del vRPO las que proyectando a RMc producen la atonía típica del sueño REM (Kodama y col., 1998 y Lai y col., 1999), si bien podrían existir distintos mecanismos.

A esto hay que añadir que en la mayoría de las neuronas del tronco del encéfalo pueden colocarse dos o más neurotransmisores (normalmente un péptido), y se desconoce si su mecanismo de actuación podría ser competitivo o sinérgico.

Hemos de recordar que también existen vías de conexión directa desde el tegmento pontino ventral oral hasta la médula espinal, (de modo que la influencia pontina en la actividad motora se produciría por una vía directa además de por la vía indirecta, polisináptica, anteriormente descrita), como fue mostrado en diversos trabajos de estudio de conexiones con técnicas de degeneración para el trazado de vías (Papez, 1926; Torvik y Brodal, 1957). En estos trabajos se describía una conexión básicamente ipsilateral, que incluía tanto a neuronas gigantes como a otras de inferiores tamaños también en esta zona, y que procedía desde las porciones más caudales de este núcleo. Estudios más recientes efectuados con trazadores también muestran este tipo de conexión (Tohyama y col., 1979; Matsuyama y col., 1997, 1999). Sin embargo esta conexión directa parece regular el tono de las extremidades en los movimientos complejos de estas (Mori, 1987; Mori y col., 1992; Takakusaki y col., 1993; Matsuyama y Drew, 1997; Matsuyama y col., 1997). Existe a su vez también conexión bilateral desde médula espinal hasta el núcleo reticular oral pontino, como muestra el trabajo de Rossi y Brodal, 1956b.

## **7. Conexiones entre vRPO y RMc**

Las conexiones entre vRPO y RMc han sido establecidas mediante métodos de trazado de vías (primeramente por sistemas de degeneración y posteriormente con técnicas de transporte axonal de trazadores, Sakai y col., 1979 y 1981; Luppi y col., 1988; Matsuyama y col., 1993; Reinoso-Suárez y col., 1994 y Lai y col., 1999) y mediante procedimientos electrofisiológicos. Todos estos trabajos señalan una estrecha conexión entre estas estructuras, pero no entran en la valoración específica del tipo de neuronas del vRPO que proyectan al RMc y de la forma de terminación de las fibras procedentes del RMc sobre las neuronas del vRPO. Sin embargo, esta valoración es imprescindible para el conocimiento en

profundidad de los mecanismos fisiológicos de la atonía durante el sueño REM y de la fisiopatología de las alteraciones del tono en el ciclo vigilia-sueño. Este estudio solamente puede hacerse a nivel de microscopía electrónica y es el objetivo fundamental de esta tesis doctoral, como planteamos en el capítulo siguiente.

## **II.**

# **Planteamiento y Objetivos**

## PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

### Planteamiento

Las descripciones que existen en la literatura, efectuadas a nivel de microscopía óptica, acerca de los modos de terminación de las fibras aferentes a formación reticular sólo nos dan idea de la extraordinaria complejidad de las mismas. Ramón y Cajal (1909) señaló: i. las neuronas de la formación reticular reciben terminales tanto sobre soma como sobre dendritas; ii. existen terminales de tipo *en passant* y botones terminales; iii. existen botones terminales con aspecto de grandes masas tortuosas; iv. la disposición de las terminales depende de la orientación de las neuronas sobre las que se encuentra y del intersticio próximo, pero generalmente existen dos direcciones dominantes, una transversal a la formación reticular blanca y otra ánteroposterior en la formación reticular gris; v. los diferentes tipos de neuronas reciben diferente número de terminales, siendo las que menos reciben las más pequeñas. Scheibel y col. (1955) muestran: i. la complejidad de aferentes en las células de la formación reticular estudiadas por el método de Golgi; ii. la existencia de patrones diversos de convergencia de aferentes; iii. mientras algunos sistemas aferentes ejercen conexiones muy extensas con unidades de la formación reticular, las de otros sistemas aferentes por el contrario son escasas. En el trabajo de 1958, Scheibel y Scheibel señalan: i. la mayor parte de las arborizaciones dendríticas son perpendiculares al eje mayor del tronco del encéfalo; ii. la no aparición de células tipo II de Golgi con axones cortos; la mayoría de los axones reticulares parecen proyectar a largas distancias arriba o abajo en el tronco del encéfalo, con un gran número de éstas con colaterales frecuentes; iii. la dispersión retículo-reticular, que se debe no solamente a la existencia de colaterales axónicas, sino también a la bifurcación terminal de la fibra cuando alcanza su nivel último, pudiendo de este modo activar un determinado número de células en paralelo, pudiendo por tanto establecerse circuitos altamente complejos. En el trabajo de Rossi y Brodal (1956a) efectuado con métodos de plata, se muestra la gran variabilidad en tamaños y formas de los botones terminales que rodean a las neuronas reticulares, y Rossi y Zanchetti (1957) ya plantean el interés de una investigación que intente relacionar la morfología de las terminales nerviosas con su origen y, de este modo, con su posible significación funcional, y también para permitir la caracterización de las sinapsis en las diferentes zonas reticulares, así como un análisis detallado del patrón de terminación de las fibras aferentes.

De Robertis, en 1955, estudió ultraestructuralmente la formación reticular, y destacó la posible importancia de relaciones mediante “contactos íntimos” entre fibras nerviosas, aunque no llegaran a mostrar entre ellas verdaderas sinapsis. Sin embargo, no se había hecho ningún trabajo de microscopía electrónica sistemático sobre la formación reticular del tronco

del encéfalo, como ha ocurrido con otras regiones del sistema nervioso central, hasta el efectuado por De la Roza y Reinoso-Suárez (1997, 1998, 2000) sobre la organización sináptica de las terminales axónicas en el vRPO. Este trabajo es un estudio ultraestructural cuantitativo donde se clasifican las terminales sinápticas del vRPO en seis tipos y se determina su distribución sobre el soma y las dendritas de las neuronas de esta región. Los autores concluyen que las neuronas del vRPO muestran, entre sí, una amplia variabilidad respecto a sus características ultraestructurales y que ello podría explicar la participación de diferentes neuronas en redes neuronales relacionadas con distintas funciones del vRPO. Por ello, creen necesario relacionar los diferentes tipos de neuronas con los impulsos sinápticos que reciben y con el órgano diana al que proyectan, de esta forma se podría saber si las neuronas implicadas en una función concreta tienen unas características ultraestructurales específicas, que las diferencian del resto de neuronas de este núcleo.

Este estudio es el primer intento de ese objetivo. Como hemos visto (Fig. 2) el vRPO debe, a través de sus proyecciones sobre las estructuras responsables de las diferentes manifestaciones que caracterizan el sueño REM, conseguir la armónica inducción del mismo. El RMc es la estructura principal responsable de la atonía del sueño REM. Nuestra hipótesis es la siguiente, para avanzar en el conocimiento de las bases morfológicas que fundamentan las relaciones entre vRPO y RMc tiene un gran interés investigar: el tipo de neuronas del vRPO que proyectan al RMc y el número de terminales nerviosas que reciben, las características ultraestructurales y la distribución de las terminales procedentes del RMc sobre las neuronas del vRPO y la organización de dichas terminales dentro de los circuitos sinápticos del vRPO.

Existen patologías en que podría existir alteración de estas relaciones: la narcolepsia y trastorno de conducta durante el sueño REM (Schenk y col., 1987; Siegel y col., 1991 y Lai y col., 1999), en las que existe una disociación entre la génesis del sueño REM y de la atonía que se produce durante el mismo. En el caso de la narcolepsia existirían dos manifestaciones clínicas (la cataplejía y la parálisis del sueño) en las que aparece atonía sin sueño REM, y que podrían tener una causa común en aquellas neuronas del tronco del encéfalo responsables de la inhibición descendente masiva de las neuronas motoras que se produce durante el sueño REM (Czeisler y Richardson, 1998). En el trastorno de conducta durante el sueño REM aparecería esta etapa del ciclo vigilia-sueño pero en ausencia de atonía. Este estudio ultraestructural de las conexiones recíprocas establecidas entre vRPO y RMc podría ayudar a esclarecer algunos aspectos de la compleja base anatómica de la alteración responsable de estas patologías.



## Objetivos

Los objetivos que nos propusimos al realizar esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Estudiar las características ultraestructurales de las neuronas del vRPO que proyectan al RMc y el número de terminales nerviosas que reciben en los cortes estudiados. En algunas de las neuronas estudiadas, se analizarán con detalle las conexiones sinápticas establecidas en distintos planos de corte.
2. Conocer la distribución de las terminales procedentes del RMc sobre las neuronas del vRPO y analizar las relaciones sinápticas establecidas con estas neuronas y con el neuropilo.
3. Investigar si hay relaciones recíprocas entre las neuronas del RMc que proyectan al vRPO y las neuronas del vRPO que proyectan al RMc.
4. Realizar un estudio cuantitativo sobre las características ultraestructurales de ambos tipos de terminales, las procedentes del RMc y las de origen diverso localizadas sobre las neuronas del vRPO que proyectan al RMc.
5. Mediante un estudio estadístico comparativo, determinar los factores que pueden influir en las características ultraestructurales de ambos tipos de terminales nerviosas.

# **III.**

## **Material y Métodos**

## MATERIAL

### 1. Casuística

En la realización de esta tesis se han utilizado nueve gatos adultos, de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 2,5 y 4,5 Kg. Todos los experimentos se realizaron conforme a las normas internacionales de uso de animales en investigación.

### 2. Trazadores

Para poder establecer las conexiones entre ambos núcleos de interés hemos utilizado técnicas de transporte axonal, cuyo fundamento radica en la cualidad de determinadas sustancias de ser captadas por los somas y/o las terminales axónicas de la zona en que se realiza el depósito de su inyección, de ser transportadas axonalmente y de poder ser posteriormente visualizadas mediante determinados procedimientos, en aquellas regiones anatómicas que reciben proyección de esos somas neuronales y/o que son origen de las fibras terminales que captaron la sustancia inyectada.

En nuestros casos hemos utilizado los siguientes trazadores

#### 2.1. Dextranoamina biotinilado (BDA)

Es un conjugado de la vitamina de bajo peso molecular biotina y de una dextranoamina con diferentes pesos moleculares. El dextrano biotinilado, que desde hace unos años se ha empezado a utilizar para el trazado de conexiones (Veenman y col., 1992), tiene un excelente transporte axonal inyectado por presión no sólo anterógrado (somatofugo) sino también retrógrado (centrípeto) (Rajakumar y col., 1993); este marcaje retrógrado aparece en todo el árbol dendrítico y permite su visualización a nivel de microscopía óptica y electrónica. Es incorporado por la célula por un mecanismo no totalmente conocido y transportado de forma no compartimentalizada fundamentalmente en sentido anterógrado. El trazador permanece inalterado intracelularmente durante largos períodos de tiempo, y el revelado se efectúa con técnicas sencillas.

En nuestros casos se ha conseguido un tamaño de inyección adecuado y un efectivo transporte entre los núcleos de interés en sentido retrógrado y anterógrado realizando depósitos de 100-175 nanolitros de BDA con peso molecular 10000 (Molecular Probes) en solución al 10% en tampón fosfato 0,1M de pH 7,4 (PB), inyectados por presión mediante jeringa Hamilton, y con supervivencias de 10 u 11 días.

La imagen en el microscopio electrónico tras el revelado de BDA, es la de un precipitado amorfo, electrónicamente denso, adherido a las membranas y homogéneamente distribuido por todo el citoplasma, marcando axones terminales, soma y árbol dendrítico hasta dendritas distales.

## 2.2. Peroxidasa de rabanilla

La peroxidasa de rabanilla (horseradish peroxidase o HRP), es una glicohemoproteína vegetal con peso molecular aproximado de 40000 y que posee actividad enzimática. fue descrita por primera vez en 1855, y ha sido utilizada desde los años 70 (Kristensson y Olsson, 1971) como trazador neuronal, al conocerse su propiedad de ser captada por la célula mediante un mecanismo de endocitosis, de ser transportada en la misma a través del sistema axonal de forma principalmente retrógrada y conseguirse sistemas adecuados para detectarla. Su unión covalente con una lectina, la aglutinina de germen de trigo (wheat germ agglutinin o WGA), que posee una mayor afinidad por la membrana neuronal, potencia su captación y transporte, tanto anterógrado como retrógrado, permitiendo de este modo una mejor visualización de las conexiones (Mesulam, 1982).

En nuestros estudios de conexiones, intentando minimizar la afinidad diferente de ciertas vías por el conjugado HRP-WGA, se ha utilizado una mezcla de HRP libre (solución al 30% en suero salino estéril) y HRP conjugada a la aglutinina (solución de HRP-WGA al 5% en suero salino estéril), ambas de Sigma Chemical Co. Debido a que este trazador difunde ampliamente en el tejido y a que utilizamos también la combinación HRP-WGA que mejora la captación, se hacen depósitos de menor volumen que con los otros trazadores. Por otro lado el HRP sufre una rápida degradación intracelular, principalmente por lisosomas, por lo que en nuestro caso hemos realizado pequeñas inyecciones de 25 nanolitros de HRP-WGA para evitar la excesiva difusión del trazador, y hemos evitado supervivencias de más de 48 horas para eludir la digestión lisosomal del HRP y la pérdida de su actividad enzimática. Con supervivencias de 48 horas la peroxidasa se encuentra en las zonas de proyección y existe una acumulación suficiente de la misma en las neuronas marcadas.

Su imagen observada en el microscopio electrónico varía según el sistema de revelado. Visualizado siguiendo el protocolo descrito a continuación, el precipitado producido aparece como agregados irregulares electrónicamente densos, distribuidos heterogéneamente por el citoplasma del soma y de las dendritas proximales. Además, a pesar de la corta supervivencia del animal, debido a la rápida degradación que sufre el HRP, aparecen también numerosos orgánulos intracitoplasmáticos, principalmente lisosomas, en cuyo interior se observa el producto denso de la reacción.

### 2.3. Toxina colérica

La toxina colérica, especialmente su subunidad B, ha sido también utilizada como trazador retrógrado. Es transportada en este sentido por el flujo axonal centrípeto desde su captación probablemente por unos receptores específicos de membrana, y permanece inalterada en el soma neuronal durante largo tiempo.

En nuestros casos empleamos la subunidad B de toxina colérica (CTb) conjugada con biotina con el objetivo de evitar un largo proceso de inmunohistoquímica que pudiera deteriorar la calidad de la imagen en el microscopio electrónico, dado que la histoquímica para localizar la peroxidasa preserva mejor la ultraestructura que la inmunohistoquímica para localizar la CTb. La utilizamos en una solución al 2% en PB e inyectamos distintos volúmenes (40 y 500 nanolitros) con una supervivencia de 24 horas.

### 3. Áreas bulbares inyectadas

A continuación se muestra la tabla con la relación de gatos estudiados, indicando con una "H" los gatos hembra y con una "M" los machos.

Animal	Área inyect.	Hemi-tronco	Trazador	Vol. inyect.	Super-vivencia
G1155 (H;2,6Kg)	RMc y oliva inferior	Derecho	HRP-WGA	25 nanolitros	48 horas
G1160 (H;2,2Kg)	Inadecuada	Izquierdo	HRP-WGA	25 nanolitros	48 horas
G1165 (M;2,8Kg)	RMc	Izquierdo	Tox. colérica	40 nanolitros	24 horas
G1172 (M;2,8Kg)	RMc	Izquierdo	Tox. colérica	500 nanolitros	24 horas
G1185 (M;2,5Kg)	N. reticular giganto-celular y RMc	Izquierdo	BDA	150 nanolitros	11 días

G1191 (M;3,8Kg)	RMc y oliva inferior	Izquierdo	BDA	175 nanolitros	11 días
G1197 (H;2,6Kg)	RMc	Derecho	BDA	150 nanolitros	10 días
G1216 (M;4,3Kg)	Inacecuada	Izquierdo	BDA	100 nanolitros	10 días
G1222 (M;3,2Kg)	Inadecuada	Izquierdo	BDA	110 nanolitros	10 días

La exigencia de nuestro planteamiento nos ha obligado a rechazar los dos casos de inyección de toxina colérica biotinilada debido a un inadecuado revelado del trazador y los casos G1160, G1216 y G1222 debido a que la inyección no se localizó de forma precisa en RMc.

En el estudio estadístico y microscopía electrónica cuantitativa se ha procedido a analizar los tres gatos con inyección del trazador más precisa: G1155, G1191 y G1197. El gato G1185, cuya inyección se localizó principalmente en núcleo gigantocelular sólo ha sido utilizado para proporcionar algunos aspectos descriptivos adicionales.

## MÉTODOS

### I. Procedimiento quirúrgico

#### 1. Preparación

En los casos en que el trazador precisa de un mayor tiempo de supervivencia para su efectivo transporte, ésto es, en los casos de inyección de BDA, con una supervivencia de 10-11 días, se cuidó de una forma especial las condiciones de asepsia en las intervenciones quirúrgicas. Estas consistieron en la esterilización 24 horas antes de la cirugía del material quirúrgico en autoclave (1 hora a 115°C, presión de 1 atmósfera), horno Pasteur (1 hora. a 120°C) o vapores de alcohol isopropílico con glutaraldehído al 16%, dependiendo del tipo de instrumental.

Al animal se le mantiene en ayunas durante las 12-18 horas previas a la intervención con objeto de evitar posibles complicaciones durante la anestesia.

La anestesia general es inducida mediante administración intraperitoneal de 1 cc/kg de Pentobarbital sódico al 20% (Dolethal®, 33 mgr/ml). Posteriormente, para evitar la acumulación de secreciones respiratorias, se le inyectan intramuscularmente 0.5cc de atropina (B.Braun Medical S.A.). En los casos en que es necesario, la anestesia es mantenida durante la intervención con dosis adicionales.

Una vez anestesiado, se procede al rasurado de la cabeza y colocación en mesa operatoria en decúbito prono con la cabeza fijada en aparato estereotáxico (David Kopf®). Se procede a la aplicación de una pomada oftálmica para evitar el daño corneal por desecación y a la inyección intramuscular de 250 mg de cloxacilina (Orbenín®, Beecham), como profilaxis antibiótica. En los casos de supervivencias de 10-12 días se administraron también 500mg de cloxacilina en el día previo a la intervención.

Tras desinfección de la cabeza con Povidona yodada (Betadine Quirúrgico®) se crea el campo operatorio con paños estériles dejando descubierta exclusivamente la región por donde entrará la jeringa.

#### 2. Intervención quirúrgica

##### 2.1. Exposición del cerebro

Se realiza con bisturí una incisión cutánea y aponeurótica longitudinal medial, a la altura craneal inferior posterior hasta nivel cervical superior alto. Alcanzada la calota, piel y tejido celular subcutáneo se retraen y sujetan con mosquitos, y se procede a limpiar la zona ósea de



entrada de la jeringa mediante gubia y periostotomo. Se marca lugar de punción y se perfora hasta llegar a duramadre, que se rompe con aguja estéril.

Durante toda la cirugía se evita la desecación de tejidos aplicando gasas humedecidas con suero salino estéril.

## 2.2. Inyección de los trazadores neuronales

Se realiza por presión, unilateralmente, con jeringa Hamilton (que se mantiene fija a un cabezal del aparato estereotáxico) de 0,5 ó 1,0 microlitros de capacidad a la que se ha recortado y afilado la punta con objeto de conseguir una mayor precisión en las medidas estereotáxicas.

Las medidas estereotáxicas del RMc (Fig. 1) determinadas en atlas de encéfalo de gato de Reinoso-Suárez (1961) son las siguientes: ánteroposterior, de -9,5 a -10 mm; vertical, entre 1,5 y 2,0 mm y lateral de 1,5 a 2 milímetros. Para eludir la tienda del cerebelo que en gatos es ósea en la mayor parte de los casos efectuamos una entrada oblicua de la jeringa, con un ángulo de 18°.

Con objeto de homogeneizar la solución el trazador es sonificado o centrifugado previamente a su inyección por presión, que es efectuada con la siguiente secuencia: se inyecta poco a poco, esperando un minuto tras cada pequeño volumen y de 3 a 5 minutos al concluir la operación con la jeringa mantenida in situ, después de lo cual se retira lentamente con objeto de que el trazador difunda de modo suave sin lesionar el tejido ni sobrepasar el área deseada y evitar también el reflujo del trazador por el propio trayecto de inyección.

## 2.3. Finalización de la intervención y postoperatorio

Una vez inyectados los trazadores, se suturan los tejidos blandos en un solo plano con seda 2/0, y se cubre por nebulización la herida quirúrgica con solución antiséptica (Veterín-fenicol®)

Se inyectan otros 250mg de cloxacilina intramuscular tras la operación y en los casos de supervivencia de 10-11 días se administra el antibiótico durante 3 días más valorando el estado general del gato.

En el postoperatorio se cuida la rehidratación del animal y el mantenimiento de su temperatura corporal. Todos los animales se alimentaron con normalidad antes de 24 horas después de la operación.

### 3. Período de supervivencia

El período de supervivencia ha de ser adecuado para el transporte del trazador en dosis suficiente hasta su objetivo final sin llegar a sufrir fenómenos de degradación. De este modo, nuestros tiempos idóneos de supervivencia fueron de 48 horas en el caso del HRP-WGA y de 10 u 11 días en el caso del dextrano.

## II. Perfusión del animal

Con objeto de reducir al mínimo el tiempo de anoxia que sufriría el tejido, y para conseguir una mejor fijación del mismo, se decidió el paso del fijador mediante perfusión transcardíaca, de modo que la llegada del mismo al sistema nervioso fuera a través del sistema vascular. Así, una vez finalizado el tiempo de supervivencia, el animal es sacrificado y perfundido según la pauta siguiente

Tras mantener al animal en ayunas durante las 12-18 horas previas, es anestesiado en profundidad con una sobredosis de Pentobarbital sódico administrado intraperitonealmente de modo similar al descrito para la intervención quirúrgica.

El acceso a la cavidad torácica se realizó por vía abdominal alta, de forma que una vez comprobada la profundidad de la anestesia se procede a realizar una amplia incisión cutánea abdómino-torácica que permita la apertura hasta llegar a peto esternocostal, que es seccionado bilateralmente por la línea axilar anterior, y retraído para dejar expuesto el corazón. El pericardio es reseado y se realiza una pequeña incisión en la pared del ventrículo izquierdo, introduciendo rápidamente a través del mismo hasta la aorta ascendente una cánula rígida conectada al sistema de perfusión. Una vez asegurado el extremo de la cánula en aorta se fija su posición con una pinza. Por último se secciona ampliamente la aurícula derecha para permitir la salida de los líquidos perfundidos. Se pinzó también la aorta descendente con objeto de potenciar la llegada de las soluciones al sistema vascular cerebral, logrando de este modo una perfusión más efectiva del encéfalo.

Para el estudio ultraestructural de los tejidos, en el cual éstos son observados con un gran número de aumentos, es imprescindible una conservación óptima de la arquitectura y composición tisular. En nuestro caso este hecho tenía que ser compatible con una adecuada visualización del trazador. Para lograr este objetivo hemos infundido con una bomba de perfusión de flujo variable las siguientes soluciones después de filtrarlas para evitar que impurezas obstruyeran el árbol vascular: En primer lugar se perfundió suero salino fisiológico estéril a temperatura ambiente al que se ha añadido heparina (1cc por cada 1000cc de suero) para evitar la posible formación de coágulos sanguíneos. Se perfunden unos 500cc hasta que el sistema vascular es vaciado de su contenido hemático permitiendo la llegada a

los tejidos de la solución fijadora. A continuación se pasó la solución fijadora a 4°C (recién preparada y ajustada a un pH de 7,3-7,4 con ácido clorhídrico o hidróxido sódico), compuesta por una mezcla de paraformaldehído (Panreac Química S.A., PF) al 2%, glutaraldehído (Merck, GA) al 1% y cloruro cálcico (Cl<sub>2</sub>Ca) del 0,5% al 0,4% (0,02%) si el trazador utilizado fue BDA y de PF al 2%, GA al 2,5% y Cl<sub>2</sub>Ca del 0,5% al 0,4% (0,02%), diluidos en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 (PB) en los casos en que la inyección fue de HRP-WGA o toxina colérica. Se perfunden 3000cc a una velocidad que asegure el paso del fijador durante un mínimo de 45 minutos. Seguidamente, en el caso de las inyecciones de HRP-WGA, se inició crioprotección mediante perfusión de soluciones de sacarosa en PB.

### **III. Procesamiento del cerebro**

#### **1.Extracción del cerebro**

Una vez finalizada la perfusión, se procede a la decapitación del animal, y se extirpan los tejidos blandos y la bóveda craneal para finalmente realizar la apertura y separación de la duramadre.

Una vez extraído el cerebro se seleccionan dos bloques: uno de ellos contiene el bulbo raquídeo y por tanto el lugar de la inyección y el otro contiene la protuberancia que incluye la porción ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO).

El bloque del lugar de la inyección se crioprotege por inmersión en soluciones crecientes de sacarosa en PB al 10 y al 20% hasta que se hunde en las soluciones y posteriormente se mantiene en sacarosa al 30% en PB a 4°C hasta ser cortado.

El bloque de protuberancia es seccionado inmediatamente de modo que un rápido procesamiento permita la visualización en el microscopio electrónico con una óptima conservación de la ultraestructura. Previamente al corte, se secciona oblicuamente uno de los colículos inferiores de forma que sea posible con posterioridad orientar correctamente el tejido.

#### **2. Corte del cerebro**

El bloque de cerebro correspondiente al vRPO, que va a ser estudiado a nivel de microscopía electrónica, se corta con vibratomo (Lancer Vibratome, Series 1000, Pelco® Electron Microscopy Supplies, Ted Pella Inc.) para conseguir una buena conservación de la ultraestructura. Se realizan cortes de 60-70µm que se recogen de forma seriada en PB (para posterior tinción de Nissl y se usarán para una correcta delimitación de las estructuras anatómicas) y en PB con sacarosa al 10% para iniciar la crioprotección de los cortes en que

se va a revelar el trazador tras congelación y descongelación rápida en nitrógeno líquido. Estos cortes se pasan posteriormente a sacarosa al 20 y al 30% en PB. El paso por estas soluciones hiperosmolares reduce la hidratación tisular, disminuyendo así la posibilidad de formación de microcristales en la ulterior congelación del tejido.

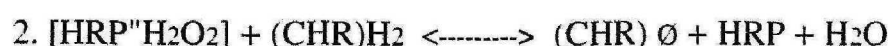
La sección del bulbo, con el lugar de la inyección, se realiza en microtomo de congelación (Leica SM 2400) que lleva acoplado un sistema de congelación del tejido, de forma que gracias al mismo y con ayuda de nieve carbónica triturada, el tronco del encéfalo se mantiene a  $-30^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente. Los cortes, de  $50\mu\text{m}$ , se realizan en el plano coronal, y se recogen en PB a  $4^{\circ}\text{C}$  de forma ordenada y seriada: una primera serie para tinción de la sustancia de Nissl con objeto de delimitar de forma exacta los núcleos de interés, y una segunda serie, con cortes consecutivos a la primera, para revelado del trazador. A medida que se van realizando los cortes se hace un pequeño orificio con punzón en el lado contralateral al área inyectada, con objeto de permitir la correcta posterior orientación de los mismos.

Las series de vRPO y de RMc seleccionadas para la tinción de Nissl se montan en portaobjetos gelatinizados.

### 3. Revelado de los trazadores neuronales

En las series de vRPO que van a ser observadas en el microscopio electrónico, previamente al revelado en ocasiones se realiza una crioprotección adicional de tiempo variable en una solución de baja molaridad (30% de sacarosa, 10% de glicerina en PB 0.01M a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación continua). A continuación, se someten a una congelación rápida en nitrógeno líquido, con una descongelación subsiguiente y lavados repetidos en PB salino. El objetivo de esta congelación es incrementar la permeabilidad de las membranas celulares para facilitar el paso de los anticuerpos, ya que no se van a usar detergentes para evitar un mayor daño del tejido)

Ambos sistemas referidos a continuación, para el revelado de los trazadores HRP y BDA, utilizan la capacidad enzimática de la peroxidasa con el objetivo de obtener un producto de reacción visible en el lugar en que existe la misma. Las reacciones químicas que se producen son las siguientes, siendo "CHR" la sustancia cromógena donante de hidrógenos que finalmente cambia de color y precipita (símbolo  $\emptyset$ ), siendo DAB en el caso del dextranoamina biotinilado y TMB para el revelado de la peroxidasa conjugada con aglutinina de germen de trigo:



La peroxidasa cataliza la reacción de conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; el oxígeno oxida el cromógeno, que polimeriza y adquiere un color intenso. El producto de la reacción coloreado precipita y pone de manifiesto la actividad de la HRP.

### 3.1. Revelado de BDA

Se realiza siguiendo el método descrito por Rajakumar y col., 1993, con algunas modificaciones. El fundamento de la reacción radica en utilizar la actividad enzimática de la peroxidasa en combinación con la alta afinidad que la glicoproteína avidina tiene por la vitamina de bajo peso molecular biotina, a la que se une con un enlace persistente, y para la que cuenta con cuatro lugares de unión. Esta técnica ofrece en consecuencia una alta sensibilidad y fiabilidad.

Con objeto de conservar mejor la ultraestructura en los cortes de vRPO se realizan pequeñas variaciones en el revelado respecto a los que van a ser estudiados en el microscopio óptico. Así, los cortes son incubados en solución del complejo macromolecular avidina con peroxidasa biotinilada (ABC-Vectastain Elite Kit, Vector Labs) al 1:100 ó 1:120 en PB salino (para eliminar la posibilidad de interacciones iónicas no deseadas) en el caso de los cortes de vRPO y de PB más 0,2% de tritón X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol, Sigma Chemical Co.) con objeto de favorecer la penetración transmembrana, en el caso del lugar de la inyección, durante aproximadamente 48 horas en el primer caso y de alrededor de 24 horas en el segundo.

Posteriormente se lavan los cortes y se procede a revelar la peroxidasa utilizando la 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co.) como cromógeno y procediendo a una intensificación con cloruro de cobalto y sulfato de níquel en el caso del lugar de la inyección.

Así, para revelar el lugar de inyección se realiza una preincubación (con objeto de incrementar la penetración de la diaminobenzidina en el tejido) en DAB al 0,05% en PB más cloruro de cobalto del 1% al 2,2% y sulfato de níquel del 1% al 1,9% y posterior incubación durante 3-6 minutos en la misma solución más peróxido de hidrógeno al 0,003% (no se utilizó una concentración más alta de éste con objeto de no aumentar la reacción de fondo, lo cual haría disminuir la especificidad). Mediante observación en microscopio óptico se comprueba la adecuada relación marcaje específico-reacción de fondo y la reacción se detiene con lavados repetidos en buffer a baja temperatura. El DAB en presencia de níquel y cobalto produce en el tejido un precipitado de color gris-negro. La estabilidad del producto permite su conservación en PB a 4°C hasta su montaje.

Para los cortes de vRPO se realiza una preincubación en DAB al 0,05% en TRIS (Trizma Base y Trizma Hydrochloride, de Sigma Chemical Co., pH 7,6, 0,05M), e incubación posterior durante aproximadamente 3 minutos en la misma solución más peróxido de



hidrógeno al 0,003%. Se para la reacción mediante lavados en el tampón utilizado previamente a 4°C. En este caso, en el que se utiliza DAB en ausencia de ciertos cationes bivalentes, el producto de la reacción adquiere un tono marrón.

### **Protocolo de revelado de BDA**

1. Lavados del tejido en el mismo tampón que va a ser utilizado durante este proceso
2. Incubación en una solución del complejo avidina-biotina-peroxidasa al 1:100 ó 1:120 en PB salino durante 48 horas a 4°C en agitación, si los cortes van a ser examinados en el microscopio electrónico, o de PB más 0,2% de tritón durante 24 horas a 4°C también en agitación, si el estudio se va a efectuar en el microscopio óptico.
3. Lavados en el mismo tampón (3x10 minutos). En los cortes para microscopía electrónica se realizan posteriormente lavados (2x20 minutos) en TRIS, pH 7.6, 0.05M
4. Preincubación: 15 minutos en agitación, a temperatura ambiente, en DAB al 0.05% en TRIS (secciones para ME) o en DAB al 0.05% en PB más  $\text{Cl}_2\text{Co}$  del 1% al 2,2% y  $\text{NiNH}_4\text{SO}_4$  del 1% al 1,9% en PB en las secciones para microscopía óptica.
5. Incubación durante 3-6 minutos en agitación continua, a temperatura ambiente, en las soluciones respectivas anteriores más peróxido de hidrógeno al 0,003% (partiendo de la solución comercial al 33%, diluyendo en agua destilada)
6. Se para la reacción con el tampón a 4°C
7. Lavados finales en el mismo tampón

### **3.2. Revelado de HRP-WGA**

Se realiza mediante reacción histoquímica, en la que se utiliza la propiedad enzimática de la propia peroxidasa, la cual permite obtener un producto de reacción visible con una gran sensibilidad. Básicamente la reacción consiste en incubar el tejido en una solución que contiene el sustrato del enzima, peróxido de hidrógeno, en cuya presencia la peroxidasa (a través del átomo de hierro que posee en el grupo hemo) adquiere propiedades oxidantes que hacen que la sustancia cromógena seleccionada precipite y cambie de color, de forma que es fácilmente visualizable en el microscopio óptico.

Así, siguiendo el protocolo de Mesulam, 1978, con algunas modificaciones, se incuban los cortes sueltos en una solución que incluye agua oxigenada (como sustrato de la enzima peroxidasa), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (como sustancia cromógena más sensible, Mesulam y Rosene, 1979 y Mesulam, 1978 y 1982, que es oxidada durante la reacción) (TMB, Sigma Chemical Co.) y nitroferriicianato sódico (como estabilizador del producto



precipitado), en tampón acetato pH: 3,3 (para evitar la redisolución de la TMB a pH básico). La cantidad de sustrato que se añade es variable dependiendo, entre otros factores, de la fijación del tejido, y se determina con unas pruebas en cortes sueltos de cada animal: en nuestros casos el resultado fue óptimo con 0,75cc de peróxido de hidrógeno al 1% (partiendo del preparado comercial de agua oxigenada al 33%, Panreac Química S.A., diluyendo en agua destilada) por cada 100cc de la solución de incubación.

Para evitar cualquier tipo de precipitado que pudiera alterar los resultados de esta reacción es necesario un cuidado exhaustivo en la limpieza de todos los materiales que son utilizados durante la misma, incluyendo lavados con lejía y con alcohol.

#### **Protocolo de revelado de HRP-WGA**

1. Lavados rápidos en tampón acetato al 5% en agitación a 4°C (tampón acetato 0.2M, pH 3,3)
2. Preincubación: 10 minutos en agitación, a temperatura ambiente, en solución de nitroferriicianato sódico (0,7g) en agua destilada (740ml), más tampón acetato 0.2M, pH 3,3 (40ml), más tetrametilbenzidina (0,04g) en alcohol etílico absoluto (20ml)
3. Incubación primera: 10 minutos en agitación, a temperatura ambiente, en la solución de preincubación a la que se añade agua oxigenada al 1% en cantidad variable (partiendo de la solución comercial al 33%, diluyendo en agua destilada)
4. Lavados (3x5 minutos) en tampón acetato al 5% a 4°C en agitación constante
5. Incubación segunda: 10 minutos en agitación, a temperatura ambiente, en solución con nitroferriicianato sódico, tampón acetato, tetrametilbenzidina y agua oxigenada en iguales proporciones que en la primera incubación.
6. Lavados (un mínimo de 5 x 5 minutos) en tampón acetato al 5% en agitación a 4°C

Tras la reacción, es preciso el montaje inmediato en tampón acetato al 5% a 4°C en portaobjetos gelatinizados para evitar una redisolución del producto final en el medio líquido. El almacenamiento de los cortes debe hacerse en oscuridad a 4°C para prevenir la degradación de dicho producto.

#### **4. Revelado de la arquitectura**

La técnica histológica de Nissl nos ha permitido delimitar con exactitud el área inyectada y la zona de vRPO que mantiene conexiones con ella.

Esta técnica revela la citoarquitectura, de forma que al visualizar las agrupaciones de cuerpos neuronales en los distintos núcleos es posible identificar la zona del sistema nervioso central que estamos visualizando. Se basa en la afinidad de los colorantes catiónicos (en nuestro caso del violeta de cresilo de Merck, colorante básico de anilina) por los ácidos nucleicos del núcleo y de los ribosomas citoplasmáticos (a los que se une por un mecanismo físico-químico de atracción electrostática), con una posterior diferenciación en alcohol-cloroformo. Realizamos el protocolo estándar de nuestro laboratorio sobre cortes previamente montados en portaobjetos gelatinizados.

#### **Protocolo para tinción de Nissl**

1. Se dejan los cortes (ya montados sobre portaobjetos gelatinizados) en alcohol de 70° durante 12 horas aproximadamente y se lavan después con agua destilada.
2. Tinción con 500ml de Violeta de Cresilo al 0,1%, al que se añaden 2,5ml de ácido acético al 10%. Se mantienen en agitación al baño maría a 50°C durante 7 minutos.
3. Se efectúan dos lavados en agua destilada y paso durante 0,5-1 minuto por alcoholes de 70 y 96°
4. Paso por cloroformo al 100% durante 10 minutos, en agitación continua.
5. Diferenciación: en solución de alcohol de 96° con un 2% de ácido acético
6. Paso por alcohol de 100° y finalmente xilol durante 45-60min. hasta cubrir utilizando DePeX

#### **5. Finalización del procesamiento de los cortes para microscopía óptica**

La serie de cortes con el lugar de inyección en los que se ha revelado previamente el BDA, se montan sobre portaobjetos previamente gelatinizados (solución de gelatina y sulfato crómico potásico en agua destilada para favorecer la adherencia del tejido). El montaje se realiza en tampón fosfato, a excepción de los cortes procesados para HRP-WGA, los cuales se montan en tampón acetato de pH ácido (pH3,3) para evitar la redisolución de la TMB. Los cortes se dejan secar al aire.

Posteriormente se procede a la deshidratación de estos cortes y de aquéllos en que se ha realizado la tinción de Nissl mediante el paso por soluciones de alcohol (a concentraciones progresivamente crecientes de 70°, 80°, 96°, 100° y 100°), durante 3-5 minutos en cada una de ellas. En las series destinadas al estudio de la HRP-WGA el paso ha de ser más rápido, de 10 segundos, para impedir la pérdida de marcaje y es preciso utilizar alcoholes ácidos (alcohol etílico absoluto, en tampón acetato pH 3,3 al 5%) en los primeros pasos por alcoholes (70, 80 y 96°).

Por último se realiza el desengrasado del tejido en xilol, durante al menos una hora, cambiando varias veces a un xilol limpio. Finalmente los portaobjetos son cubiertos con cubreobjetos de cristal utilizando DePeX (Serva) como adhesivo. Posteriormente se guardan en oscuridad a 4°C para evitar la pérdida de marcaje hasta su estudio.

## **6. Procesamiento de los cortes para microscopía electrónica**

Tras congelación y descongelación rápida en Nitrógeno líquido y posterior revelado del trazador, se seleccionan los cortes con marcaje para procesarlos de acuerdo con las técnicas de fijación e inclusión usadas en microscopía electrónica.

Para ello se realiza una postfijación en tetróxido de osmio (Serva) al 1% durante un mínimo de 30 minutos (visualmente se controla la adecuada postfijación del tejido y el buen estado del tetróxido de osmio, que al oxidarse va adquiriendo una coloración rosada), y tras lavar los cortes en PB, se inicia la deshidratación en alcoholes al 50, 70, 90, 96 y 100% (cuidando el estiramiento de los cortes montándolos en placa de Petri durante el paso por los alcoholes de 90 y 96°). Simultáneamente se efectúa una tinción en bloque con acetato de uranilo (Merck) al 1% en alcohol de 70° durante 30-40 minutos, con objeto de mejorar el contraste de las membranas en su observación en el microscopio electrónico. Posteriormente se realizan dos lavados en óxido de propileno (Merck) y se mantienen toda la noche en el mismo y resina Durcupán (ACM, Fluka) al 50%, para completar al día siguiente la inclusión en resina. Para ello, los cortes se depositan sobre pequeños vasos de precipitados de modo que queden cubiertos por nueva resina (cuidando evitar la formación de burbujas) y se mantienen en condiciones de baja humedad y vacío parcial durante cuatro horas, para posteriormente montarlos en la misma resina sobre portaobjetos forrados con pioloformo (Taab Laboratories Equipment Ltd.) al 1% en tetraclorometano (Panreac Química S.A.) y cubrirlos con cubreobjetos de plástico. Después de esto, se introducen en estufa a 56-60°C durante 48 horas para la polimerización de la resina.

**Protocolo de fijación e inclusión del tejido para microscopía electrónica**

1. Lavado de los cortes en tampón fosfato 0,1M, pH7,4 (PB): 3 lavados x 10min
2. Postfijación en tetróxido de osmio al 1% en PB durante un mínimo de 30min pero controlando visualmente el estado del tejido
3. Lavados en PB: 2 lavados x 10min
4. Paso por alcohol de 50 y de 70° durante 5min en cada uno
5. Tinción en bloque con acetato de uranilo al 1% en alcohol al 70% recién filtrado durante 30 minutos. Se protege de la luz.
6. Lavados en alcohol de 70°: 2 x 5min
7. Se continúa la deshidratación de los cortes con paso de los cortes por alcoholes de 90 y 96° durante 5min montados en una placa de Petri para evitar la contracción excesiva del tejido
8. Finalización de la deshidratación mediante paso de los cortes en alcohol puro, 100%: 3 lavados de 10min
9. Lavados en óxido de propileno: 2 x 10min
10. Mantener los cortes en una solución al 50% de Durcupán y óxido de propileno durante aproximadamente 12horas
11. Montaje en resina y conservación de los cortes en estufa de 56°C durante 48horas

Tras la selección de las áreas de interés se procederá a la reinclusión, corte y tinción, como será descrito en un siguiente apartado.

## **IV. Estudio del material**

### **1. Estudio de los lugares de inyección**

Para el estudio de los lugares de inyección se ha utilizado un microscopio binocular Laborlux 12 (Leitz) y objetivos (Leitz Wetzlar) de 1,6 a 40 aumentos. En el caso de la inyección de HRP-WGA (considerando las propiedades birrefringentes de los granos de peroxidasa) se ha completado la información mediante estudio paralelo en campo oscuro con el mismo microscopio. La zona se ha localizado con exactitud gracias a la tinción citoarquitectónica de Nissl en el corte adyacente.

Los lugares de inyección consistieron en un núcleo central, con el principal depósito del trazador y con un elevado número de neuronas marcadas, y un halo periférico en el que había una difusión parcial del mismo con un escaso número de neuronas marcadas.

Posteriormente se han realizado fotografías del lugar de depósito principal del trazador.

## **2. Estudio de las conexiones en vRPO**

### **2.1. Examen de las preparaciones en el microscopio óptico**

En primer lugar se procedió a la observación de las preparaciones en microscopio óptico binocular Laborlux 12 (Leitz) y objetivos Leitz Wetzlar de 1.6 a 40 aumentos. Las series procesadas para el revelado de la arquitectura son estudiadas paralelamente con microscopía óptica de campo claro y utilizadas para identificar las áreas que presentan marcaje en los distintos animales, siguiendo los criterios de los trabajos arquitectónicos existentes en la literatura. Al utilizar secciones adyacentes es posible utilizar como referencia estructuras que no cambian en la distancia que existe entre ambos cortes y permite delimitar con una mayor precisión las estructuras anatómicas.

Se realizaron dibujos en cámara clara (Leitz Wetzlar, Germany) a 1,6 aumentos de todos los cortes del puente en que estaba el vRPO, y se señalaron en ellos las neuronas marcadas retrógradamente.

Posteriormente se delimitó con exactitud la zona correspondiente a la porción ventral del núcleo reticular oral del puente, utilizando nuevamente como referencia el corte adyacente teñido con violeta de cresilo. Las neuronas marcadas en la zona de interés fueron dibujadas nuevamente con cámara lúcida, en esta ocasión con objetivos de 10 aumentos, y algunas de ellas fueron fotografiadas.

### **2.2. Estudio de las conexiones en el microscopio electrónico**

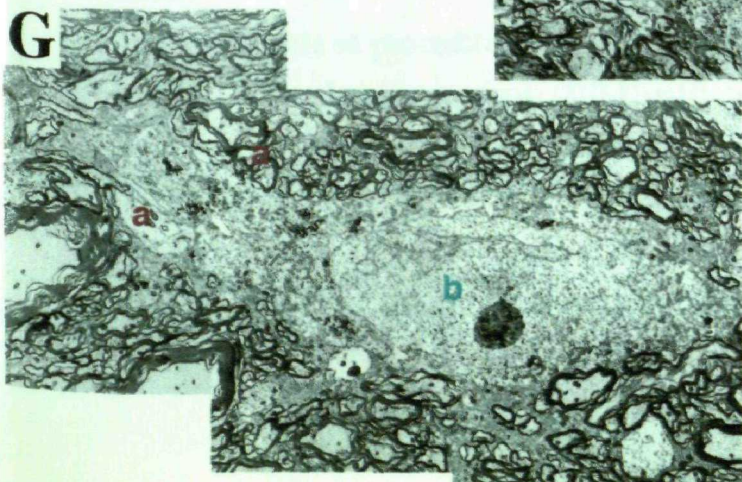
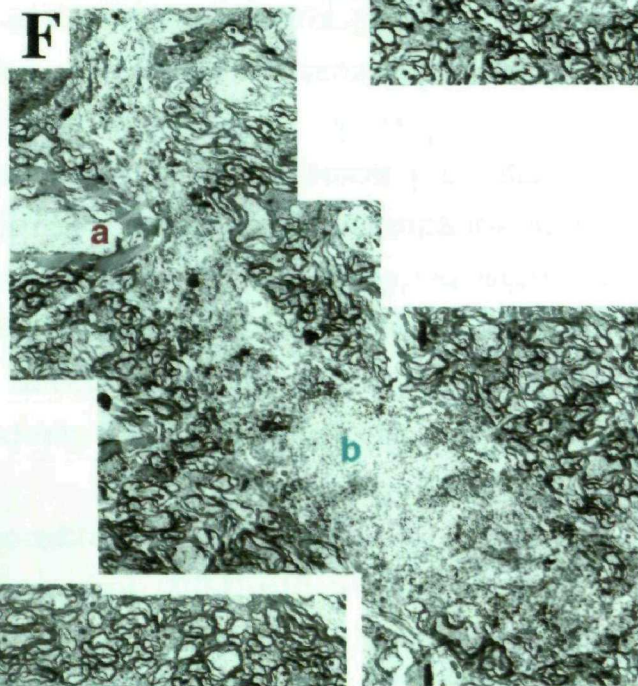
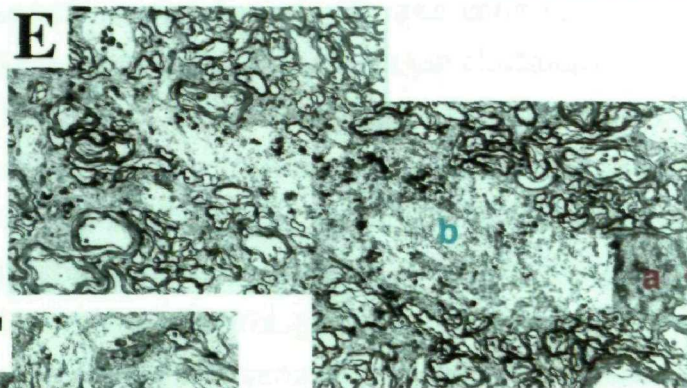
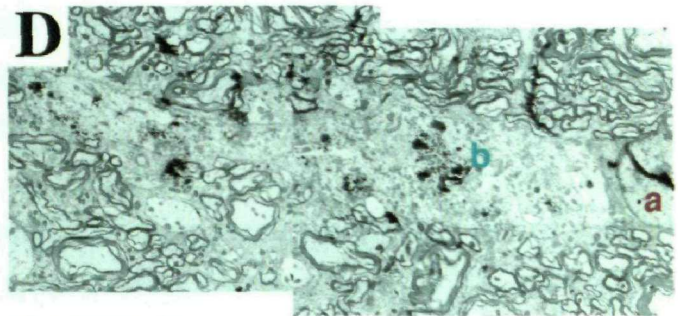
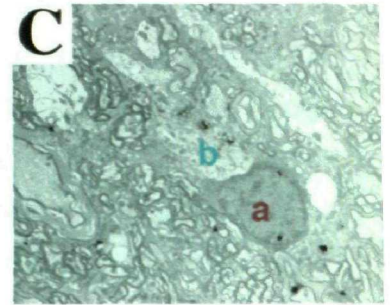
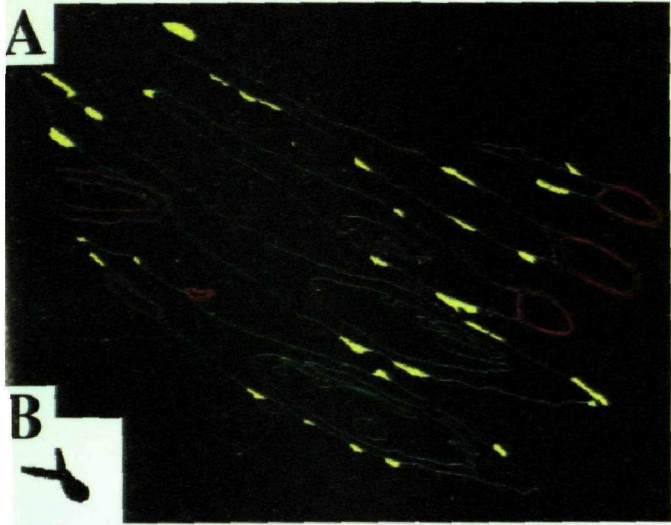
#### **2.2.1. Selección del material**

Se seleccionaron al azar, entre los cortes de vRPO que contenían neuronas marcadas retrógradamente, aquellas zonas que iban a ser analizadas en el microscopio electrónico. Bajo observación con lupa de 6 a 50 aumentos (Wild, Heerburgg) se cortaron trozos pequeños de tejido que fueron adheridos con cianoacrilato a un bloque de resina. Allí fueron tallados a mano o con cuchilla de cristal para dar a las preparaciones forma de trapecio (con objeto de incrementar la estabilidad para el corte y permitir la correcta orientación del mismo), y posteriormente delimitada la zona sobre el dibujo original de RPO. Al menos 4 hemisecciones de vibratomo (7 en G1155, 5 en G1191 y 4 en el caso G1197) fueron



**Figura 3.** Diferentes imágenes de la neurona 3. **A:** Representación de los distintos niveles de corte dibujados con el programa informático Neurolúcida, a partir de las microfotografías tomadas en el microscopio electrónico y que se muestran en la serie **C** a **G**. En granate estructuras de referencia (a); en azul, la neurona marcada (b), y en amarillo, las terminales sobre la misma. La figura **B** muestra un dibujo de esta misma neurona realizado en cámara lúcida, desde observación en microscopio óptico, previo a la sección de cortes ultrafinos.





examinadas por animal, y excepto en los casos de estudio ipsi y contralateral, con una distancia mínima entre ellas de 120  $\mu\text{m}$ .

En un ultramicrotomo (Ultracut-E de Reichert-Jung) y con cuchilla de cristal recién preparada se realizaron cortes semifinos (de 1 ó 2  $\mu\text{m}$ ) hasta llegar al tejido en el caso de inyecciones de BDA, en el que también se efectuaría un estudio de las terminales marcadas anterógradamente. Se procedió entonces a obtener, en este caso con cuchilla de diamante, cortes ultrafinos de 60-80 nanómetros (600-800 Angstrom) cuya coloración es entre plateada y dorada), que se recogieron, tras ser extendidos con vapores de tetraclorometano, sobre rejillas de ojal forradas con pioloformo al 1% en cloroformo. Estas porciones de tejido más superficiales contenían un mayor número de axones terminales marcados ya que, especialmente al no utilizar tritón, tanto el complejo avidina-peroxidasa biotinilada, como los productos utilizados para el revelado, tenían un mejor acceso a las porciones de tejido más superficiales.

Posteriormente se realizaban cortes semifinos de 2  $\mu\text{m}$  que se recogían en una gota de agua bidestilada sobre cubreobjetos de cristal (para su ulterior reinclusión, en caso necesario), hasta llegar a la neurona marcada retrógradamente. De este corte se realizaba un dibujo a cámara clara para su posterior orientación en el microscopio electrónico. Posteriormente se realizaban 11 ó 12 cortes ultrafinos de 60-80 nanómetros, recogidos sobre rejillas de ojal forradas con pioloformo para permitir la completa visualización de la neurona (procurando poner el mayor número de cortes por rejilla). Después de ello, se obtenían 2 cortes semifinos de 2  $\mu\text{m}$  sobre portaobjetos gelatinizado, para valorar en ellos la neurona marcada a nivel de microscopía óptica que en algunos casos era fotografiada. Nuevamente se obtenían 11 ó 12 cortes ultrafinos seriados, y se repetía esta secuencia hasta la terminación de la neurona (Fig.3).

Para mejorar la visualización de las membranas y la calidad de la imagen, los cortes ultrafinos fueron teñidos con acetato de uranilo a saturación en metanol durante 5 minutos. Después de un tiempo mínimo de media hora para que se sequen los cortes, se tiñeron con citrato de plomo al 0,4% en hidróxido sódico 0,1M durante 3 a 5 minutos. Inmediatamente antes de su utilización, tanto la solución de uranilo como la de plomo fueron filtradas para evitar impurezas que pudieran contaminar las preparaciones (filtros Millipore Millex-GV4 de 0,22  $\mu\text{m}$ ).

Posteriormente se procedió al examen cuidadoso de los cortes a 10000-15000 aumentos en microscopio electrónico Jeol (JEM1010) y se fotografiaron todas las terminales y neuronas marcadas observadas, dejando entre cada corte estudiado un mínimo de 4  $\mu\text{m}$ , para evitar el estudio repetido de una misma terminal, y realizando en los casos necesarios fotografías a pequeño aumento para observar y discriminar con precisión la estructura postsináptica. Las fotografías de las terminales se realizaron con unos aumentos de 15000 a 30000, para observar más detalladamente las características de la sinapsis. La clasificación e



identificación de los elementos celulares se basa en la descripción de Peters y col., 1976 y 1991. En total se hicieron 1500 fotografías del vRPO.

### 2.2.2. Análisis de las observaciones

Las microfotografías fueron positivadas y a partir de ellas se realizó:

1. Un estudio morfológico sobre: i. **Las características ultraestructurales de las neuronas marcadas retrógradamente** que incluye el tamaño y la morfología de las neuronas y de sus núcleos y nucleolos. Además se estudiaron **las características ultraestructurales, el número y la disposición de las terminales nerviosas localizadas sobre estas neuronas** en los cortes estudiados. Para el análisis de las características ultraestructurales de estas terminales se usó la metodología descrita en el apartado anterior. El programa Neurolúcida se usó para dibujar todas las neuronas estudiadas con las terminales nerviosas localizadas sobre ellas, en los diferentes planos de corte observados. Se calculó el número de terminales nerviosas observadas en 100  $\mu\text{m}$  de membrana neuronal para expresar su **frecuencia** sobre el soma y las dendritas. También se calculó el porcentaje de membrana (somática o dendrítica) cubierta por terminales nerviosas.

ii. **Las características ultraestructurales de las terminales marcadas y su distribución sobre las neuronas del vRPO.** Este estudio incluye un análisis estadístico descriptivo de las características morfológicas de las terminales; es decir, de su tamaño (área y perímetro), número de mitocondrias, área mitocondrial, longitud de aposición y longitud de la zona activa en los contactos sinápticos. Además, se analizó la forma de las terminales, la morfología de sus vesículas y el tipo de contacto sináptico establecido, cuando fue posible ya que la presencia del trazador dificultaba este análisis. Por otra parte, se prestó atención a la presencia de *puncta adhaerentia* y retículo endoplásmico en las terminales o de orgánulos adyacentes a la membrana post-sináptica. Se observó si las terminales estaban rodeadas por glía o por otras terminales, dado que en trabajos recientes (Senba y Tohyama, 1985; Sotelo y col., 1986; Milner y Pickel, 1986; Ilinsky y Kultas-Ilinsky, 1990; Aicher y col., 1995; Kultas-Ilinsky y col., 1997; Van Bockstaele y col., 1998 y otros), se ha valorado el interés de estas relaciones. Se estudió también con detalle la estructura postsináptica, con objeto de analizar sus características (perímetro, y posibles orgánulos postsinápticos, entre otras). Para conocer la distribución de las terminales sobre las dendritas, se midió el diámetro perpendicular al eje mayor de las mismas, y se clasificaron las dendritas en tres grupos de acuerdo con su diámetro (de 0,2 a 1  $\mu\text{m}$ , de 1 a 2  $\mu\text{m}$  y mayor de 2  $\mu\text{m}$ ) que podrían representar a las dendritas distales, intermedias y proximales respectivamente. Para las mediciones de áreas y perímetros se utilizó el programa informático Neurolúcida, introduciendo las imágenes desde las fotografías del microscopio electrónico. Para la

obtención de medias, desviaciones estándar, histogramas de frecuencia, diagramas de correlación y otros, se utilizó el programa estadístico Statview SE+ Graphics™.

iii. **La organización sináptica de las terminales estudiadas.** Para ello se analizaron las relaciones sinápticas establecidas entre ellas y con las neuronas del vRPO.

2. Un análisis estadístico comparativo para determinar si los valores medios de las características ultraestructurales de las terminales (marcadas o no marcadas) muestran diferencias significativas respecto a: su **localización** (ipsilateral /contralateral al lugar de la inyección o el nivel rostro-caudal del vRPO), su **estructura postsináptica** (soma o dendritas de diferente diámetro) su **origen** (el RMc o un origen diverso) o el **tipo de sinapsis establecida** (simétrica o asimétrica). Previamente se analizó si había diferencias significativas entre gatos o entre distintos trazadores.

Con el propósito de conseguir unos resultados fiables se utilizaron test paramétricos como el test t de Student no pareado de dos colas y ANOVA (programa estadístico Statview). De los cuatro grupos de terminales estudiadas (terminales marcadas y no marcadas sobre soma y dendrita proximal o sobre dendrita del neuropilo), se han incluido en cada análisis aquellos grupos en que había un número suficiente de terminales para realizar estos tipos de tests. Finalmente, se utilizó el programa Cricket Graph para elaborar la mayoría de las gráficas.

**IV.**

# **Resultados**

## RESULTADOS

### I. Lugares de inyección

Como se ha señalado en el capítulo anterior, los hallazgos de este trabajo se apoyan en los datos procedentes de tres gatos (G1155, G1191 y G1197) para el estudio de características y terminales sobre neuronas de vRPO que proyectan a RMc, y de dos gatos (G1191 y G1197) para la valoración de los axones terminales marcados anterógradamente. Aspectos descriptivos adicionales fueron tomados del caso G1185.

#### 1.G1155:

El experimento G1155, consistió en una inyección de 25 nanolitros de HRP-WGA en bulbo raquídeo derecho de un gato hembra de 2,6Kg de peso; 48 horas después el animal fue perfundido. El área de inyección comprendía un halo periférico de difusión parcial del trazador y un núcleo central que ocupó la mayor parte del RMc y la oliva inferior en este nivel rostral, extendiéndose dorsalmente a la parte ventral del núcleo reticular gigantocelular y ventralmente a las pirámides bulbares, como puede ser apreciado en la figura 4A. Apenas se apreciaba reflujo del trazador.

#### 2.G1191:

En el gato G1191, macho, con 3,8Kg de peso, se efectuó una inyección de 175 nanolitros de BDA en lado izquierdo; 11 días después de la misma el animal fue sacrificado. En este caso la inyección abarcó la parte lateral del RMc extendiéndose hasta oliva inferior (Figura 4B). Lateralmente se extendió a la porción más medial del núcleo reticular lateral. Apenas existía reflujo por el trayecto de entrada de la aguja de inyección.

#### 3.G1197:

En el caso del gato G1197, hembra, de 2,6Kg de peso, la inyección efectuada fue de 150 nanolitros de BDA en bulbo raquídeo derecho. El reflujo del trazador fue mínimo y el depósito principal del mismo se situó exactamente en la porción central del RMc (Figs. 4C y 5) y se extendió ventralmente a oliva inferior y dorsalmente a la parte más ventral del núcleo reticular bulbar gigantocelular.

#### 4.G1185:

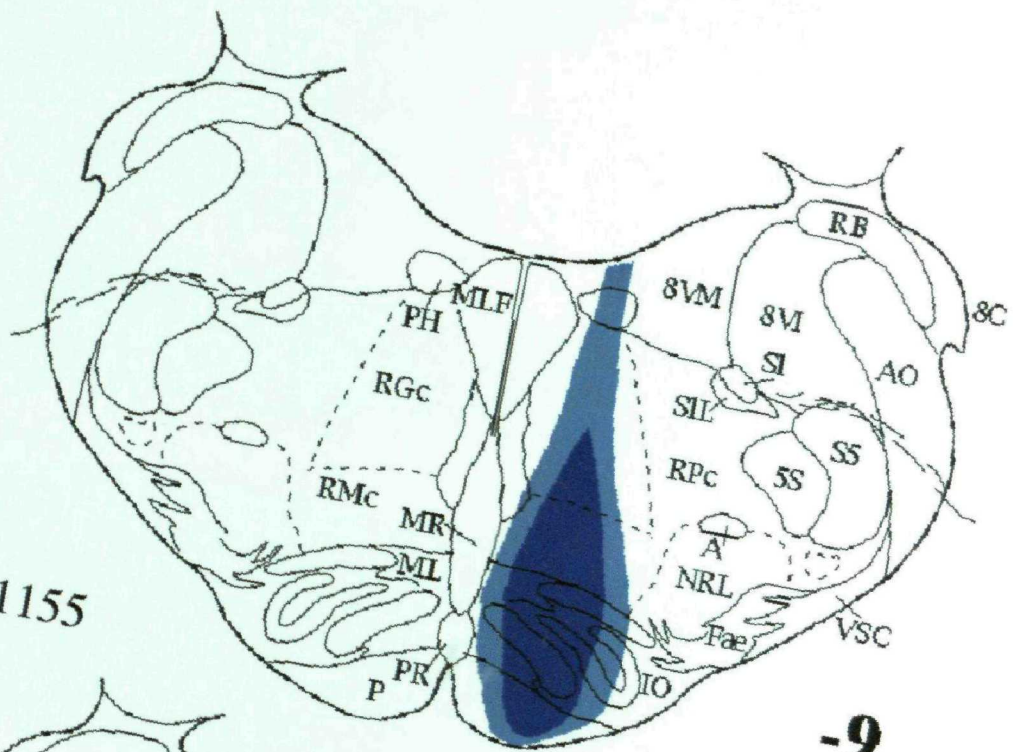
La inyección en este caso fue también de BDA, en un gato macho de 2,5Kg de peso. El volumen de trazador inyectado fue de 150 nanolitros. El material procedente de este caso sólo se ha utilizado, como se ha señalado previamente, para la obtención de datos complementarios, ya que si bien el lugar de inyección comprendía el RMc, el depósito



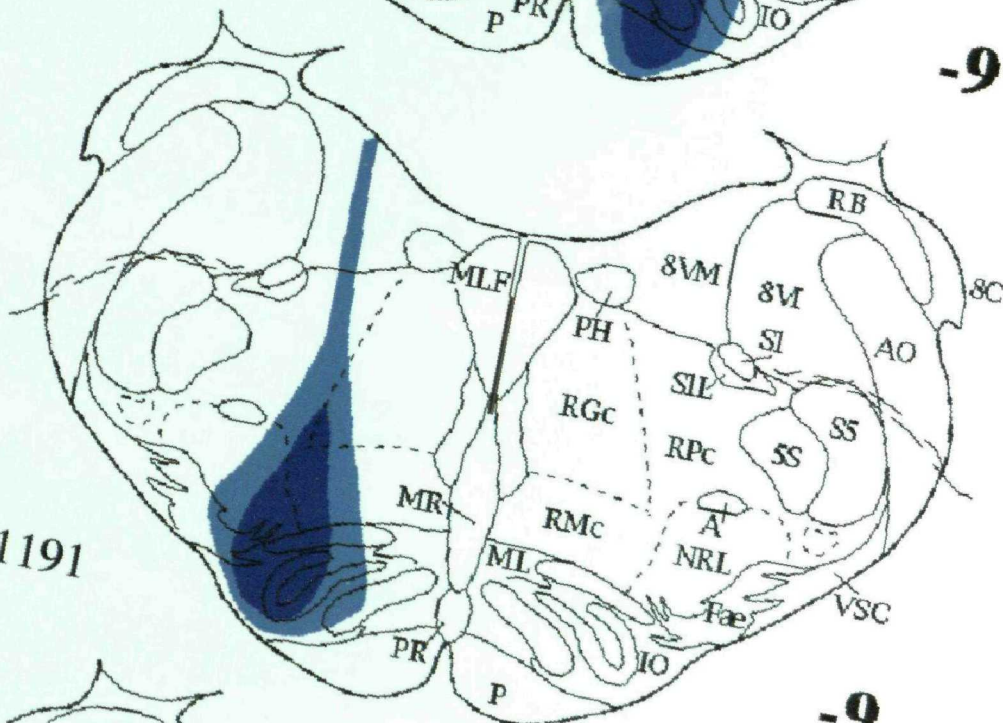
**Figura 4.** Representaciones en el plano -9 del atlas estereotáxico de Reinoso-Suárez de los lugares de inyección en los distintos gatos. **A:** G1155. **B:** G1191 y **C:** G1197. En azul mas oscuro se muestra el depósito principal de la inyección, mientras que el tono más claro de azul dibuja el área de extensión parcial del trazador.

**A**

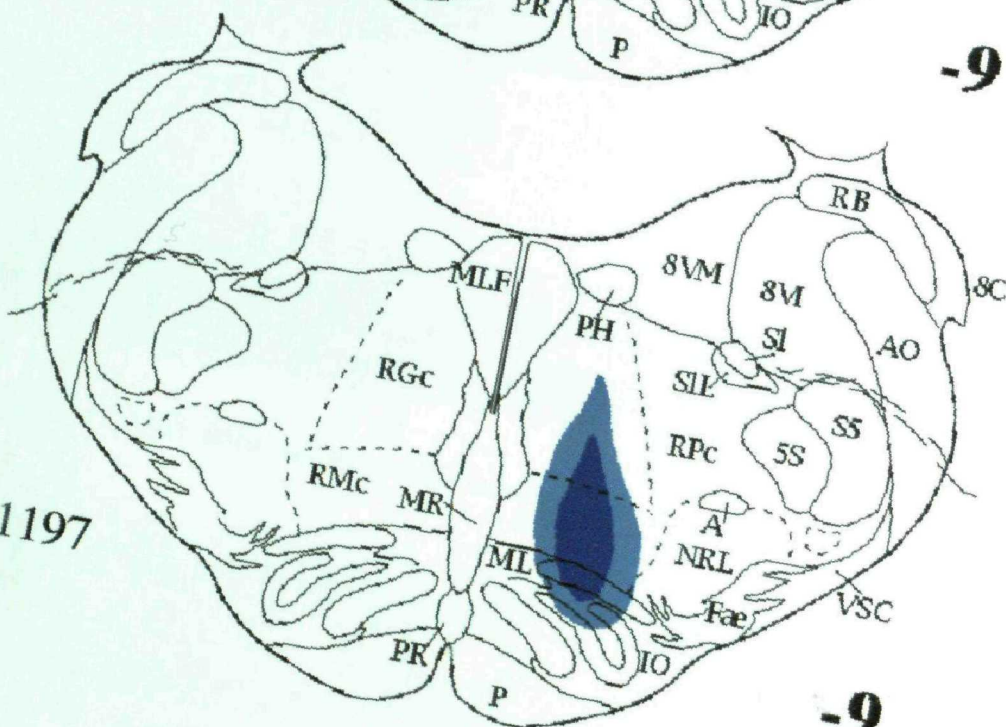
G1155

**-9****B**

G1191

**-9****C**

G1197

**-9**

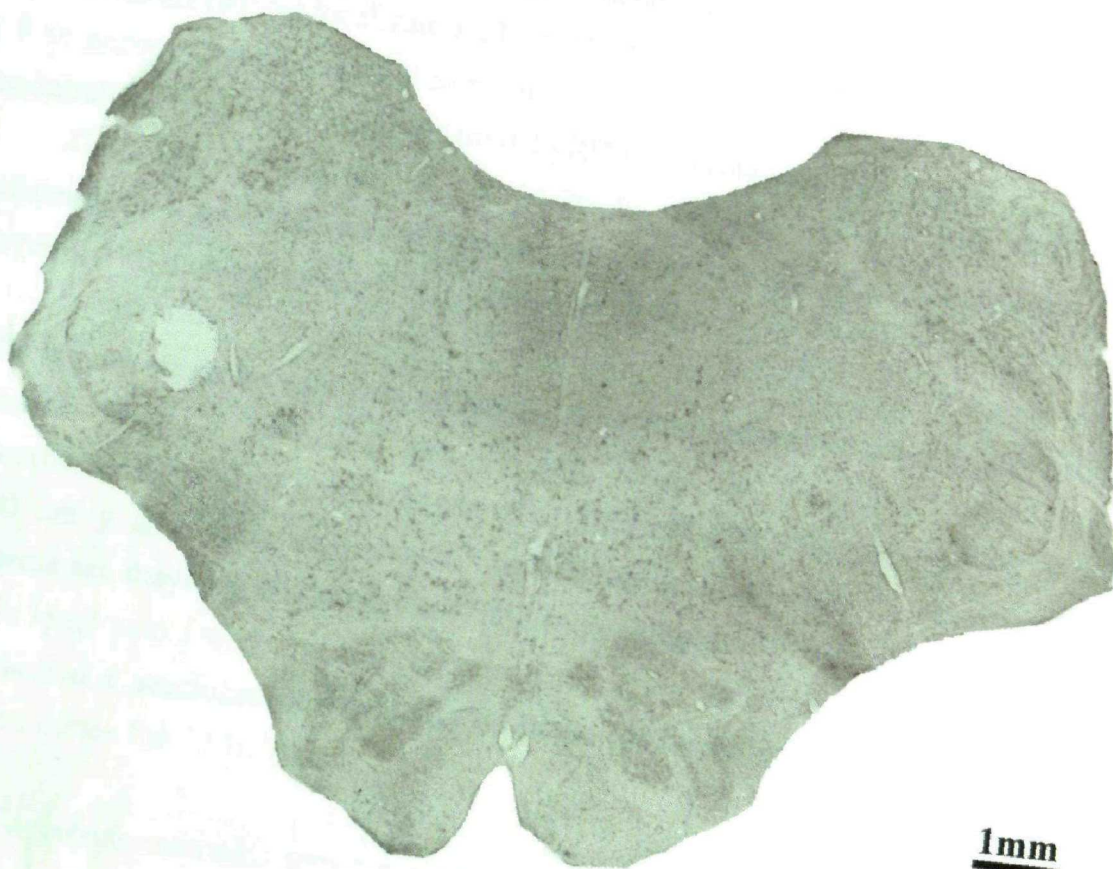
**Figura 5.** Microfotografías del lugar de inyección en el gato G1197. La figura A muestra un corte en el que se ha revelado el trazador neuronal BDA, mientras que en la figura B observamos un corte adyacente teñido con el método de Nissl, utilizado como referencia para la delimitación exacta de las estructuras anatómicas.



**A**



**B**



1mm

principal del mismo se ubicó en el núcleo reticular gigantocelular, área profusamente conectada con el vRPO, por lo que los datos obtenidos podían alterar los resultados.

## II. Conexiones entre el RMc y el vRPO

### 1. ESTUDIO DE LAS NEURONAS MARCADAS RETRÓGRADAMENTE

Este estudio tiene como objetivo la caracterización morfológica de las neuronas de vRPO que proyectan a RMc y de las terminales que reciben, además de conocer la frecuencia de dichas terminales sobre el soma y las dendritas.

#### 1.1. Soma y dendrita proximal

Del examen de las preparaciones en el microscopio óptico se han obtenido los siguientes datos:

·Gato G1155: Se encontraron 14 neuronas marcadas (Fig. 6A), de ellas 11 fueron ipsilaterales y 2 contralaterales al lugar de inyección (en uno de los casos no se pudo identificar en el corte a qué lado de la línea media se encontraba); con respecto al nivel de las mismas, 7 se encontraron en un nivel medio dentro del vRPO y 7 en un nivel caudal.

·Gato G1191: Se localizaron 23 neuronas marcadas (Fig. 6B), 17 fueron ipsilaterales y 6 se encontraron contralateralmente al lugar de inyección. 7 de ellas eran rostrales, 4 se encontraban en un nivel medio dentro del vRPO y 12 caudales.

·Gato G1197: Fueron 18 las neuronas marcadas en este caso (Fig. 6C), 14 ipsilaterales y 4 contralaterales al lugar de inyección; sus niveles de localización fueron: 2 rostrales, 5 en un nivel medio y 11 caudales en vRPO.

En la mayoría de los casos las neuronas no estaban agrupadas, observándose sólo 1 ó 2 neuronas marcadas en cada uno de los cortes de vibratomo, efectuados éstos perpendicularmente al eje mayor del tronco del encéfalo. Debido a que el grosor del corte es de 60  $\mu\text{m}$  y al sistema de revelado, probablemente el número de neuronas marcadas realmente sea mayor que el observado, pudiendo agruparse las mismas en este caso en un sentido longitudinal en puente. En cualquier caso hemos de recordar que sólo se estudió una de cada 3 ó 4 secciones de vibratomo de 60 $\mu\text{m}$ , de modo que la distancia mínima entre distintos cortes fue de 180 $\mu\text{m}$ .

Las neuronas marcadas mostraron una gran variedad de formas y tamaños (Tabla 1). Algunas de ellas tenían forma bipolar (Fig. 7A) con el soma alargado y unas pocas dendritas

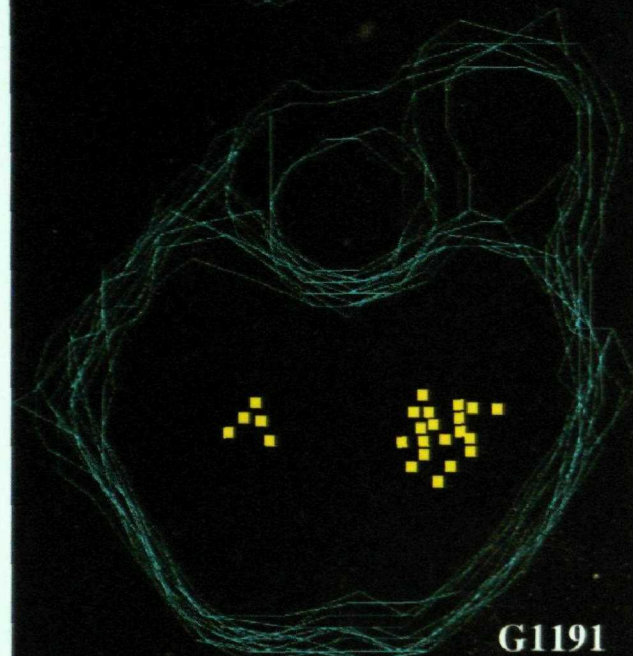
**Figura 6.** Reconstrucción del segmento de protuberancia en que se sitúa el vRPO a partir de las secciones coronales del mismo en que se reveló el trazador, con el programa informático Neurolúcida. Los cuadrados amarillos señalan las neuronas marcadas retrógradamente tras las inyecciones en RMc. En los tres casos se representa en el lado derecho de la imagen el vRPO ipsilateral al lugar de inyección.



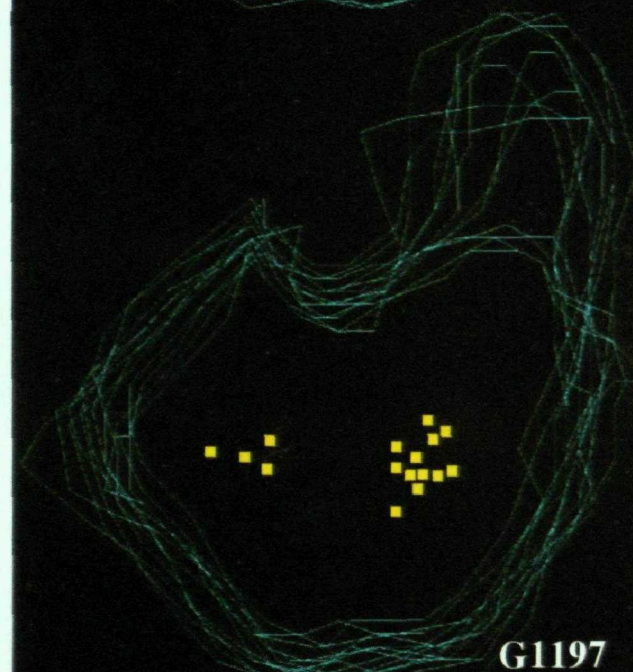
**A**



**B**



**C**

















**Contralateral**







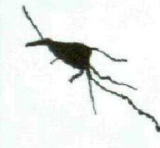




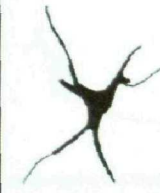

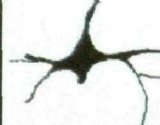

**Ipsilateral**













**Tabla 1.** Relación de neuronas marcadas retrógradamente en vRPO, numerándolas en sentido rostro-caudal en cada gato, primero las ipsilaterales y luego las contralaterales al lugar de inyección. Se señala con numeración aparte aquéllas que fueron reincluidas, siendo las destacadas con un asterisco las que fueron posteriormente analizadas en el microscopio electrónico. Aquéllas que pertenecen a un mismo corte de vibratomo se marcan con comillas.

(Neur: neurona; izq: izquierda; dcha: derecha; ipsilat: ipsilateral y contralat: contralateral, al lugar de inyección)



















GATO	NEUR.	LADO	NIVEL	IMAGEN	DIBUJO
G1155	1 - 97.14	Izq-contralat	Medio (7)		  
	*2 - 97.5,1	Dcha-ipsilat	Medio (9)		
	*3 - 97.5,2	"	"		
	4 - 97.15	ipsilat?	Medio (10)		
	*5 - 97.11	Dcha-ipsilat	Medio (11)		
	6 - 97.10	Izq-contralat	"		
	*7 - 97.12	Dcha-ipsilat	Medio (12)		
	*8 - 97.4,1	Dcha-ipsilat	Caudal (15)		
	9 - 97.4,2	"	"		
	*10-97.6	Dcha-ipsilat	Caudal (17)		
	*11-97.9	Dcha-ipsilat	Caudal (19)		
	*12-97.7	Dcha-ipsilat	Caudal (20)		
	*13-97.8	"	"		
	14	"	"		



GATO	NEUR.	LADO	NIVEL	IMAGEN	DIBUJO
G1191	15-98.26	Izq-ipsilat	Rostral (1')		
	16-98.27	"	"		
	*17-98.27	"	"		
	18	Izq-ipsilat	Rostral (3')		
	19	"	"		
	*20-98.25	Dcha-contral	Rostral (3')		
	*21-98.22	Izq-ipsilat	Rostral (4')		
	22	Izq-ipsilat	Medio (6')		
	23	Dcha-contral	Medio (6')		
	24	Izq-ipsilat	Medio (9')		
	25	"	"		
	26	Izq-ipsilat	Rostral(11')		
	27	"	"		

GATO	NEUR.	LADO	NIVEL	IMAGEN	DIBUJO
G1191	28	”	”		
	29	”	”		
	30	”	”		
	31	Dcha-contral	Rostral(11')		
	32-98.44	Izq-ipsilat	Rostral(12')		
	33-98.45	Dcha-contral	Rostral(12')		
	34-98.46	”	”		
	35	”	”		
	36-98.43	Izq-ipsilat	Rostral(13')		
	*37-98.43	Izq-ipsilat	”		

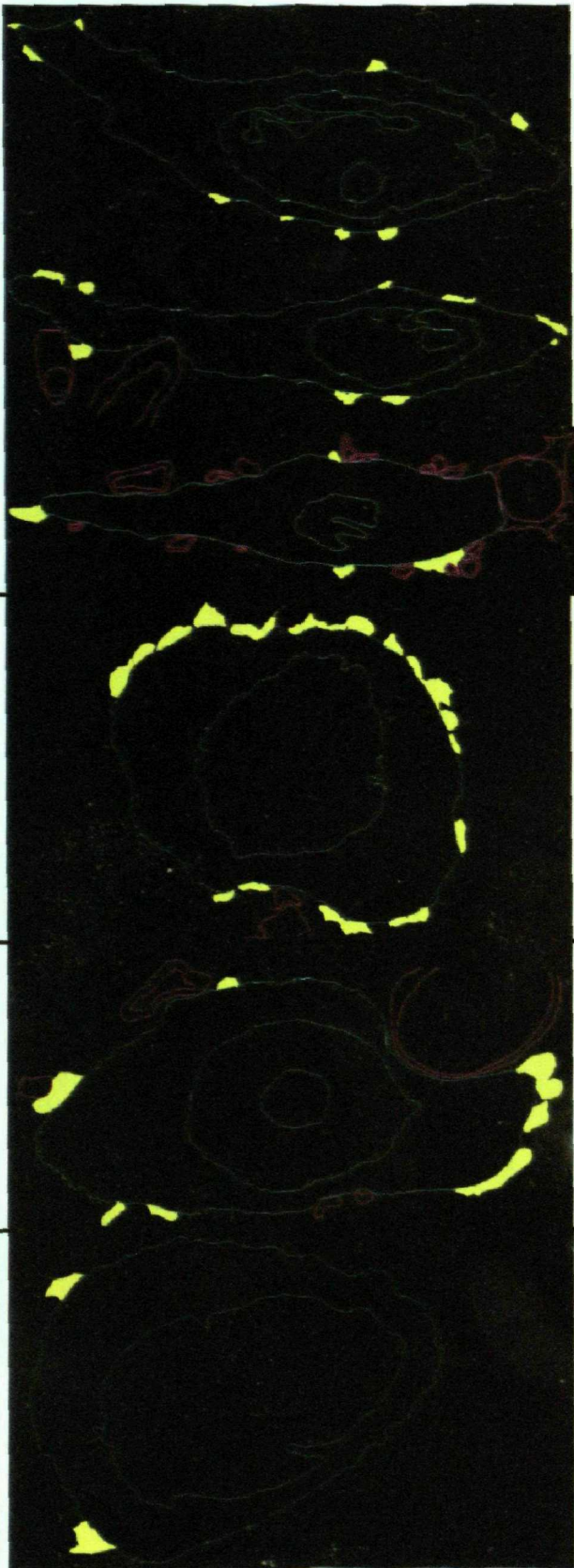


GATO	NEUR.	LADO	NIVEL	IMAGEN	DIBUJO
G1197	*38-99.21	Dcho-ipsilat	Rostral(1'')		
	39-99.22	"	"		
	*40-99.23	Dcho-ipsilat	Medio(2'')		
	41-99.20	Dcho-ipsilat	Medio(3'')		
	42-99.25	Izq-contralat	Medio(3'')		
	43-99.25	"	"		
	44	Izq-contralat	Medio(5'')		
	45	Dcho-ipsilat	Caudal(7'')		
	46	"	"		
	47	"	"		
	48	"	"		
	49	"	"		
	50-99.24	Izq-contralat	Caudal(7'')		
	*51-99.18	Dcho-ipsilat	Caudal(8'')		
	*52-99.19	"	"		
	53	Dcho-ipsilat	Caudal(9'')		
	54	"	"		
	55	"	"		

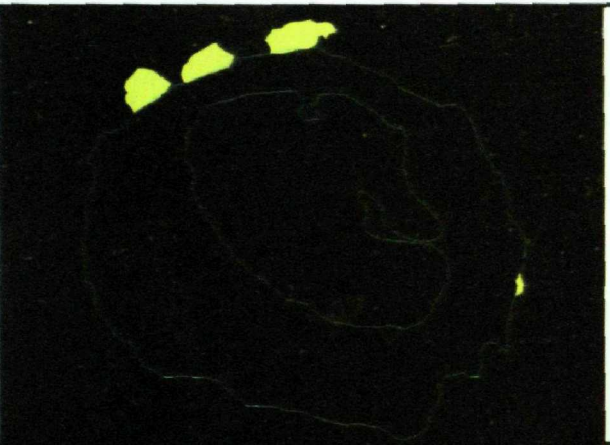
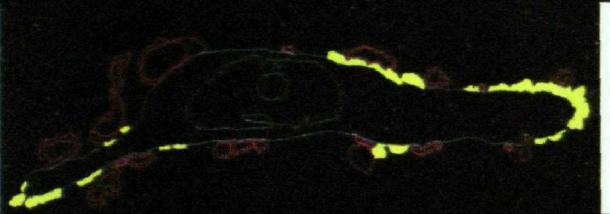
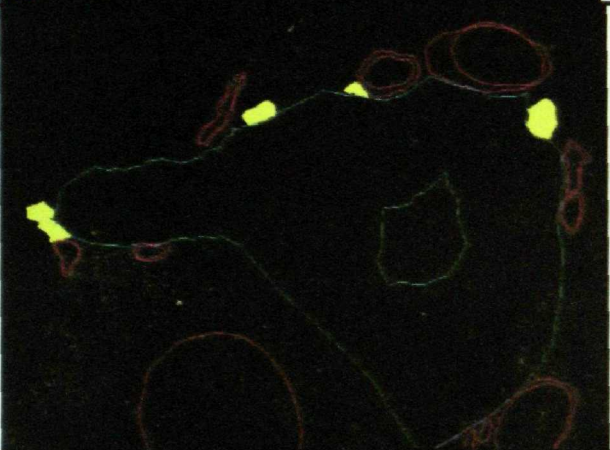
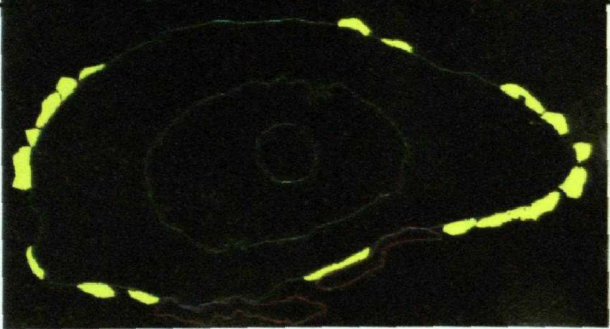


**Tabla 2.** Representaciones gráficas de las secciones a nivel de núcleo de las neuronas marcadas retrógradamente estudiadas en el microscopio electrónico. Se dibuja en azul la membrana nuclear y plasmática de dichas neuronas, mientras que el amarillo representa las terminales nerviosas adyacentes a la misma. En granate se señalan estructuras próximas de referencia.

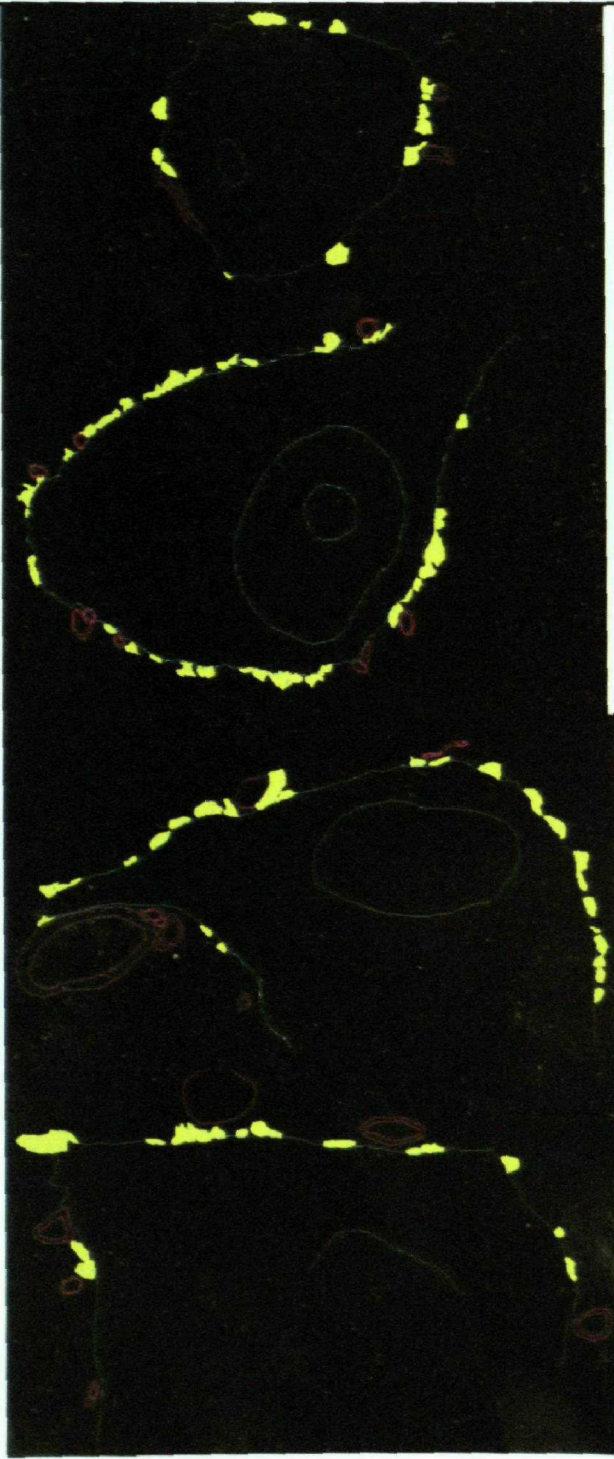
(Neur: neurona; Diám: diámetro; per o perím: perímetro; term: terminales; memb: membrana; disposic: disposición)

<u>Neurona</u> <u>Nivel</u> <u>Diám.µm</u>	<u>Per/ área</u> <u>neuronal</u> <u>µm/µm2</u>	<u>Nºterm</u> <u>/100µm</u> <u>memb</u>	<u>Perím.</u> <u>memb</u> <u>con term</u>	<u>Disposic. de term.</u>
<b>Neur. 3</b> L3 (nucleolo) 22,0x9,2	P: 52,5 Á: 143,7	13,3	12,6%	
L9 22,2x8,4	P: 62,9 Á: 159,1	17,4	15,5	
N1 14,4x6,2	P: 42,8 Á: 85,2	21,0	22,3	
<b>Neur. 5</b> (final nucleolo) 20,5x14,1	P: 59,4 Á: 238,0	40,3	45,7	
<b>Neur. 7</b> (nucleolo) 21,8x10,3	P: 52,7 Á: 145,3	17	21,4	
<b>Neur. 8</b> 14,1x10,2	P: 40,1 Á: 107,0	7,4	13	

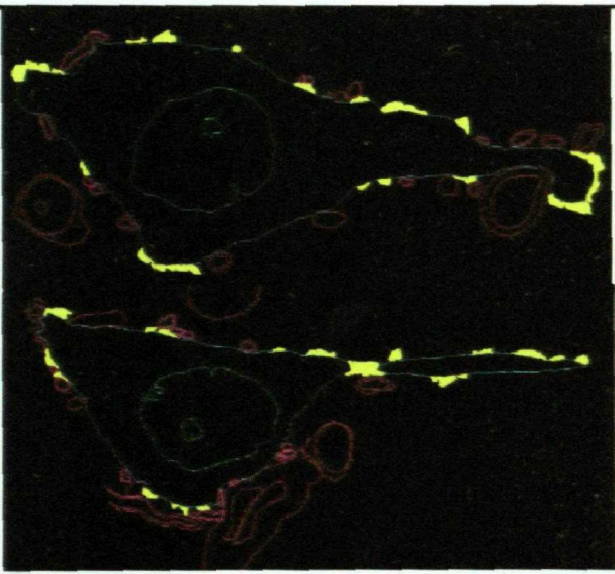


<u>Neurona</u> <u>Nivel</u> <u>Diám,µm</u>	<u>Per/ área</u> <u>neuronal</u> <u>µm/µm2</u>	<u>Nºterm</u> <u>/100µm</u> <u>memb</u>	<u>Perím.</u> <u>memb</u> <u>con term</u>	<u>Disposic. de term.</u>
<b>Neur10</b>  12,7x10,3	P: 40,2 Á: 109,1	9,9	12,4	
<b>Neur. 11</b> (nucleolo) 23,8x7,4	P: 60,7 Á: 156,6	49,3	56,7	
<b>Neur. 12</b>  20,3x17,6	P: 64,9 Á: 263,4	7,6	9,9	
<b>Neur. 13</b> (nucleolo) 29,4x14,1	P: 74,7 Á: 313,1	26,7	36,9	



<u>Neurona</u> <u>Nivel</u> <u>Diám. <math>\mu\text{m}</math></u>	<u>Per/ área</u> <u>neuronal</u> <u><math>\mu\text{m}/\mu\text{m}^2</math></u>	<u>Nºterm</u> <u>/100<math>\mu\text{m}</math></u> <u>memb</u>	<u>Perím.</u> <u>memb</u> <u>con term</u>	<u>Disposic. de term.</u>
Neur. 20				
107 17,1x15,3	P: 54,6 Á: 199,0	25,6	24,3	
137 (nucleolo) 28,1x22,9	P: 92,2 Á: 512,2	57,4	54,5	
167 (fin nucl) 39,1x29,3	P: 123,4 Á: 608,2	41,3	50,3	
197 (incompl) ?	P: 50,6 Á: ?	29,5	29,5	



<u>Neurona</u> <u>Nivel</u> <u>Diám.µm</u>	<u>Per/ área</u> <u>neuronal</u> <u>µm/µm2</u>	<u>Nºterm</u> <u>/100µm</u> <u>memb</u>	<u>Perím.</u> <u>memb</u> <u>con term</u>	<u>Disposic. de term.</u>
<b>Neur. 51</b>  92 (nucleolo) 30,0x20,0  122 (nucleolo) 27,0x16,5	P: 87,5 Á: 408,3  P: 78,2 Á: 333,7	34,2  35,8	42,8  43,4	
<b>Neur. 52</b>  29 (ppionúcl) 20,7x9,7  55 25,2x11,7  82 (nucleolo) 25,2x16,4	P: 49,6 Á: 133,2  P: 58,4 Á: 201,2  P: 74,1 Á: 273,1	20,1  27,3  26,9	23,3  38,2  35,6	



**Tabla 3.** Tabla que muestra las cuatro neuronas estudiadas en distintos planos de corte con el microscopio electrónico, completando el análisis de la tabla 2 analizando de forma más detenida las terminales halladas en los distintos niveles de profundidad desde la aparición del soma hasta la desaparición del mismo.

("Ter" o "Term": terminal; per: perímetro; %apose: porcentaje de aposición; mítoc: mitocondrial; sim:simétricas; asm: asimétricas; ?: intermedias/indeterminadas; no: no existe sinapsis; vesic: vesicular; red: redondeadas, oval ovaladas)

**Tabla 4.** Variación de las características de las terminales sobre neurona marcada a medida que nos alejamos del soma, a lo largo de la membrana plasmática, hasta dendritas de posiciones más distales.

(Dend: dendrita; redond: redondeadas; relac: relacionadas; rod: rodeadas)

**Tabla 3: Características de algunas neuronas marcadas en distintas secciones:**

Neurona, nivel área	N° ter/ 100, $\mu$ m	Per term	% aposc	Área term	Área núcleo	% terminales				Forma vesic	
						Sim	Asm	?	No	Red	Oval
<b>Neur 3</b> (Bipolar)											
-L3 (143,7 $\mu$ m <sup>2</sup> )	13,3	12,6	32,9	0,37	0,017	1/7	2/7	3/7	1/7	6/7	1/7
-L9 (159,1 $\mu$ m <sup>2</sup> )	17,4	15,5	28,0	0,51	0,028	0/11	2/11	9/11	0/11	11/11	0/11
-N1 (85,2 $\mu$ m <sup>2</sup> )	21,0	22,3	24,4	0,72	0,078	0/9	3/9	5/9	1/9	7/9	2/9
-O2 (62,9 $\mu$ m <sup>2</sup> )	16,3	20,1	32,1	0,71	0,085	1/6	2/6	3/6	0/6	3/6	3/6
-P1 (13,4 $\mu$ m <sup>2</sup> )	4,9	9,3	34,5	1,10	0,25	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1
<b>Neur 52</b> (Bipolar)											
-2 (23,4 $\mu$ m <sup>2</sup> )	19,0	30,8	32,2	1,05	0,29	3/5	1/5	1/5	0/5	2/5	3/5
-29 (133,2 $\mu$ m <sup>2</sup> )	20,1	23,3	35,1	0,45	0,08	2/10	6/10	1/10	1/10	5/10	5/10
-55 (201,2 $\mu$ m <sup>2</sup> )	27,3	38,2	34,1	0,70	0,16	6/16	2/16	1/16	7/16	6/16	9/16
-82 (273,1 $\mu$ m <sup>2</sup> )	26,9	35,6	34,9	0,59	0,12	3/20	6/20	0/20	11/20	9/20	10/20
<b>Neur 20</b> (Multipol)											
-107 (199,0 $\mu$ m <sup>2</sup> )	25,6	24,3	29,3	0,61	0,10	1/14	4/14	8/14	1/14	10/14	3/14
-137 (512,2 $\mu$ m <sup>2</sup> )	57,4	54,5	26,2	0,59	0,11	4/53	7/53	24/53	18/53	37/53	13/53
-167 (608,2 $\mu$ m <sup>2</sup> )	41,3	50,3	30,3	0,75	0,17	2/51	11/51	25/51	13/51	42/51	8/51
-197 (?)	29,5	29,5	26,8	0,56	0,11	0/15	1/15	5/15	9/15	13/15	2/15
<b>Neur 51</b> (Multipol)											
-33 (86,9 $\mu$ m <sup>2</sup> )	34,2	41,5	30,4	0,66	0,11	2/17	2/17	9/17	4/17	7/17	10/17
-61 (134,1 $\mu$ m <sup>2</sup> )	47,4	66,5	37,6	0,61	0,12	3/27	3/27	13/27	8/27	13/27	11/27
-92 (408,3 $\mu$ m <sup>2</sup> )	34,2	42,8	32,3	0,65	0,11	4/30	8/30	10/30	8/30	21/30	9/30
-122 (333,7 $\mu$ m <sup>2</sup> )	35,8	43,4	31,5	0,64	0,11	2/28	7/28	8/28	11/28	15/28	13/28

**Tabla 4: Clasificación de terminales según la estructura postsináptica:**

Term adyac a	Porcentaje de terminales		Terminales con vesículas		Porcentaje de terminales		Porcentaje term con RE
	Simétricas	Asimétricas	Ovaladas	Redond.	relac con otras	rod por glía	
Soma	12,04%	20,73%	33,4%	61,7%	41,13%	49,49%	8,69%
Dend proximal	8,74%	28,41%	29,5%	68,8%	53,55%	40,98%	15,30%
Dend neuropilo	6,71%	26,08%	22,0%	73,6%	58,10%	32,40%	16,90%

primarias localizadas en polos opuestos. Fue sorprendente el hallazgo de neuronas de proyección fusiformes muy pequeñas. Otras mostraban un soma triangular desde cuyos vértices salían tres dendritas primarias gruesas (Fig. 9A y 9B). El resto de las neuronas marcadas mostraba un soma polimórfico (redondeado, oval, triangular o poligonal) con cuatro o más dendritas primarias que irradiaban desde diferentes lugares del soma (Figs. 7B y 8B).

En el microscopio electrónico se han estudiado un total de 17 cuerpos neuronales (marcados con asterisco en la tabla 1), 9 procedentes de G1155, marcados con peroxidasa, y 8 que contenían BDA, cuatro neuronas de G1191 y cuatro de G1197. La tabla 2 muestra algunas de las características ultraestructurales de las neuronas que proyectan a RMc: su forma (aunque se aprecia mejor a nivel de microscopía óptica como se puede observar en las imágenes anteriores) y tamaño, forma del núcleo y nucleolo, número de terminales nerviosas localizadas en 100µm de membrana neuronal, porcentaje de perímetro neuronal ocupado por terminales nerviosas y distribución de las terminales sobre el soma y las dendritas proximales.

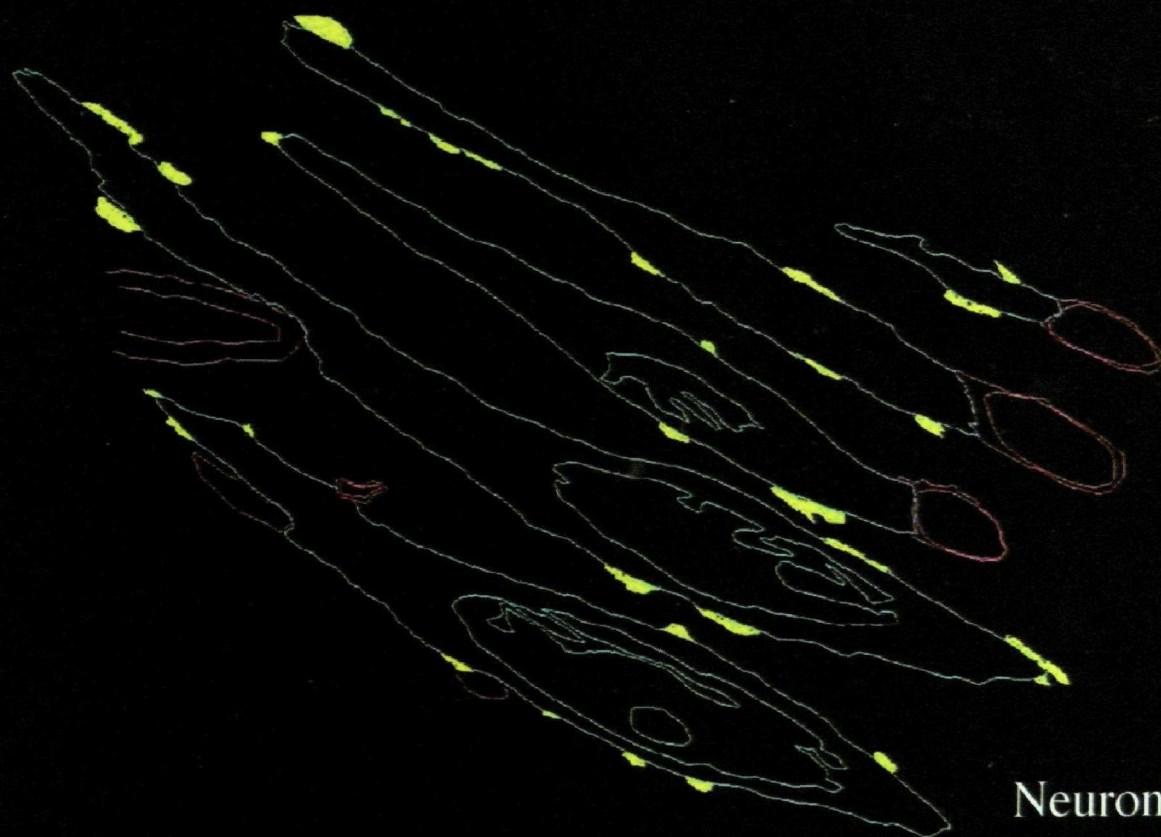
Los cuerpos neuronales estudiados ultraestructuralmente tuvieron a nivel de núcleo y nucleolo un tamaño variable que osciló entre 39,1 y 20,5µm de diámetro mayor y 29,3 y 7,4µm de diámetro menor (Tabla número 2). El producto de reacción tras el revelado del BDA se apreciaba como un precipitado granular fino homogéneamente distribuido por todo el citoplasma. Cuando el trazador utilizado era HRP-WGA, se veían agrupaciones de precipitado y cuerpos densos heterogéneos en el citoplasma y lisosomas con sus productos de degradación.

La distribución de las terminales nerviosas sobre las neuronas marcadas solía ser irregular; es decir, mientras algunas regiones de la superficie neuronal no tenían terminales otras mostraban agrupaciones de las mismas. Al comparar las neuronas multipolares medianas con las bipolares pequeñas, las primeras generalmente tenían no sólo un número superior de terminales nerviosas, sino también mayor número de terminales por 100 µm de membrana neuronal (frecuencia) y mayor porcentaje de perímetro neuronal ocupado por terminales nerviosas. En cuatro neuronas (de forma multipolar o bipolar) se estudiaron con detalle diferentes planos de corte, distantes entre sí aproximadamente 4µm (Figuras 7 y 8; Tablas 2 y 3). La Tabla 3 muestra, en los diferentes cortes analizados, características ultraestructurales de sus terminales nerviosas, número de terminales formando sinapsis simétricas o asimétricas y número de terminales con vesícula redondeada u ovalada. Ésto nos ha permitido valorar la “evolución” de la neurona, algunas características de sus aferencias en las distintas zonas de la superficie del cuerpo neuronal. Las principales conclusiones que se

**Figura 7.** Imagen correspondiente a los distintos planos estudiados de las neuronas marcadas retrógradamente 3 (figura **A**) y 51 (figura **B**) para mostrar la distribución de las terminales sinápticas que reciben. Se dibuja en azul cuerpo neuronal, núcleo y nucleolo, en amarillo las terminales adyacentes a la misma, y en color granate se señalan las estructuras próximas de interés o referencia.

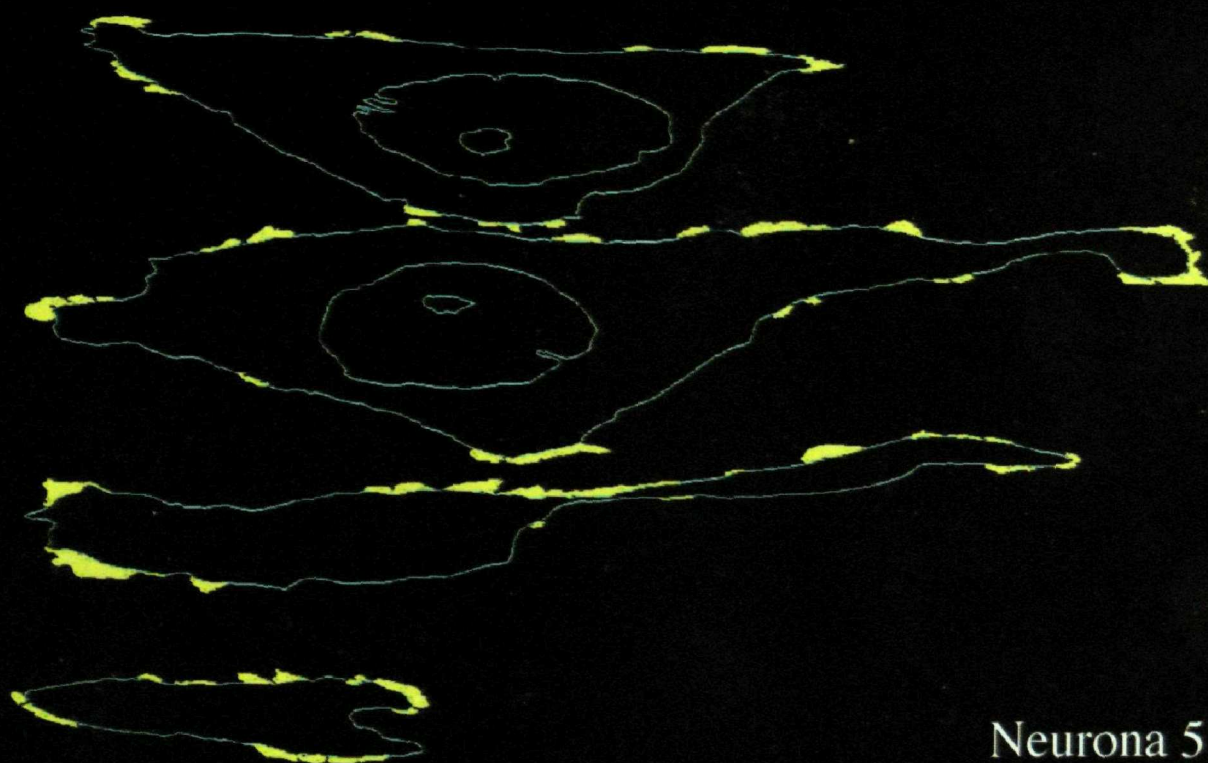


**A**



Neurona 3

**B**

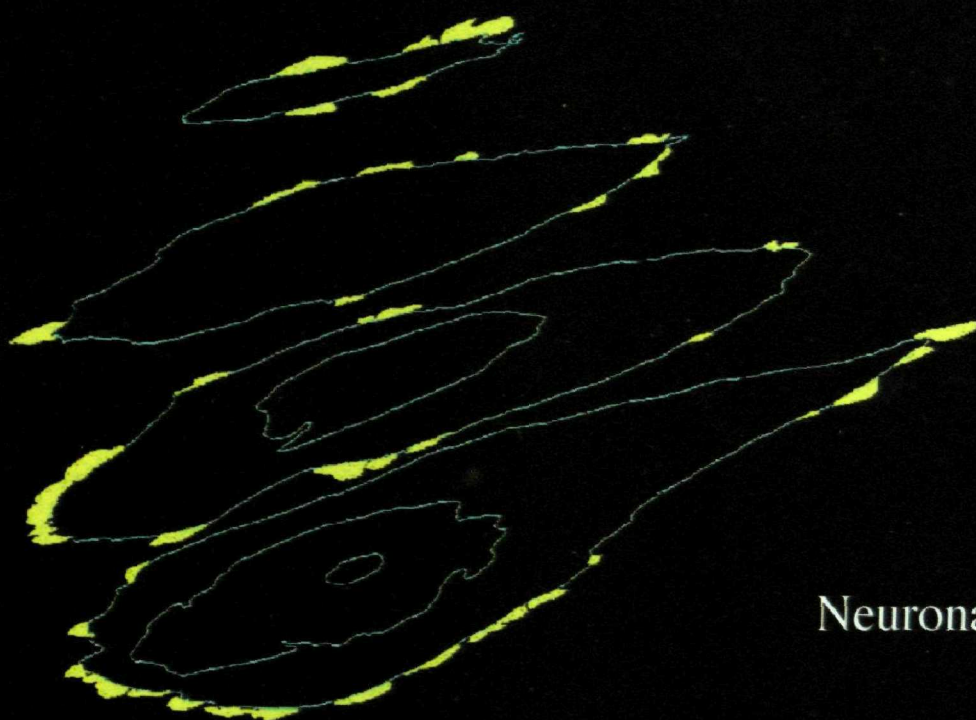


Neurona 51



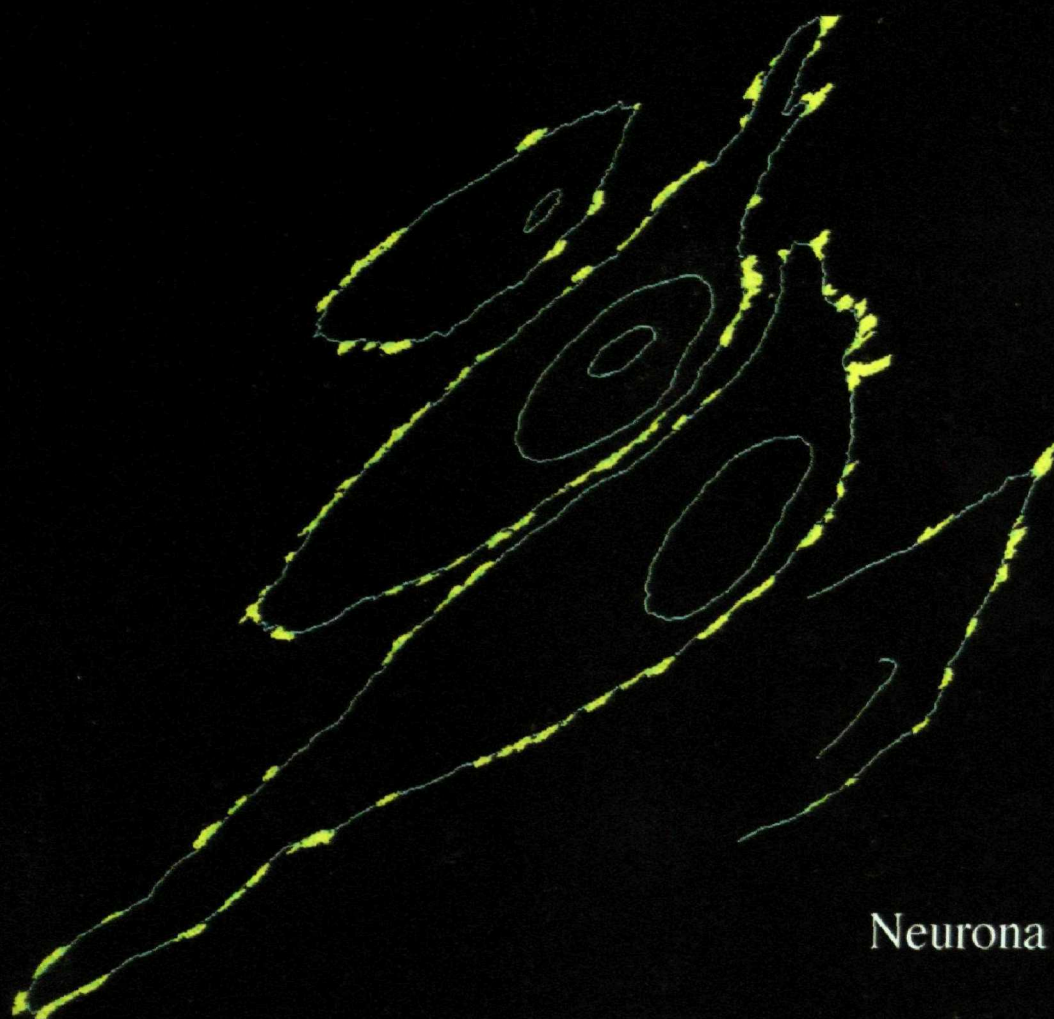
**Figura 8.** Imagen mostrando la distribución de las terminales sinápticas que reciben las neuronas marcadas 52 (figura **A**) y 20 (figura **B**). Se vuelve a utilizar el color azul para la neurona marcada y el amarillo para las terminales adyacentes a la misma.

**A**



Neurona 52

**B**



Neurona 20

deducen de esta tabla son las siguientes: i. En cada neurona, el número de terminales por 100µm de membrana neuronal y el porcentaje de membrana ocupada por terminales nerviosas suelen ser parecidos en los diferentes cortes que contienen el núcleo y menores en los cortes donde no hay núcleo. ii. Hay una gran variabilidad respecto a las proporciones relativas de los distintos tipos de terminales (caracterizadas por la morfología de la mayoría de sus vesículas o el tipo de sinapsis establecida) localizadas sobre las neuronas marcadas, no solamente entre distintas neuronas sino también entre los distintos planos de corte de una neurona.

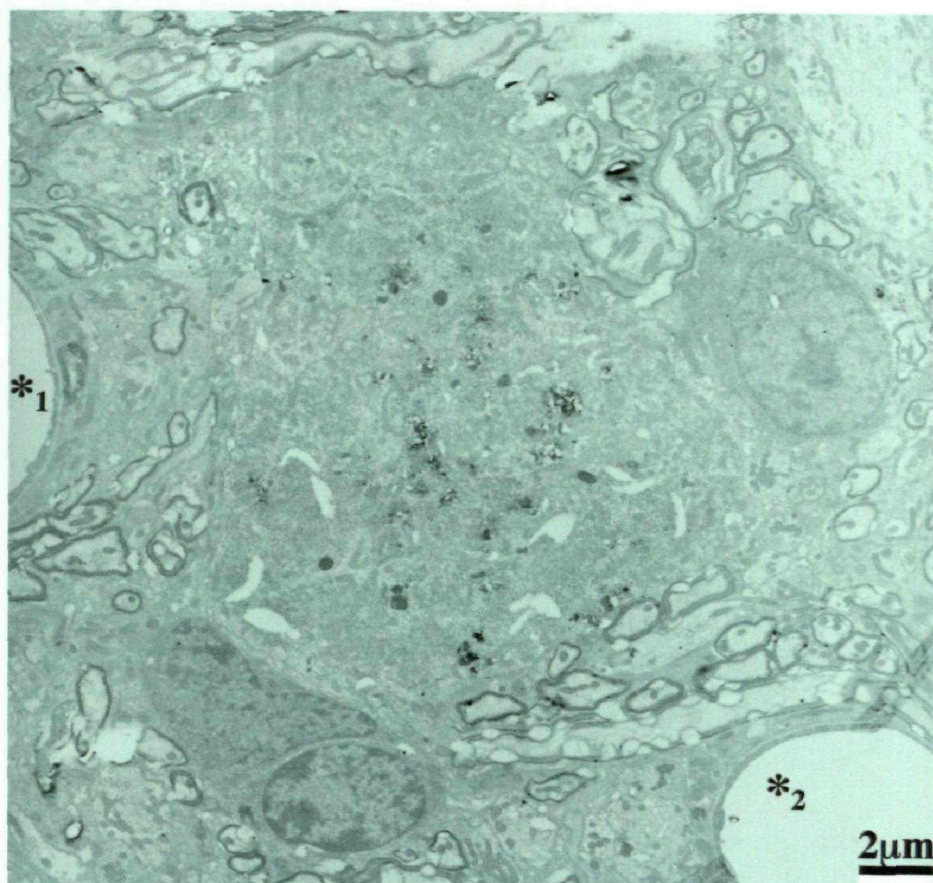
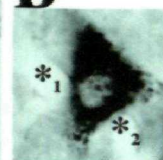
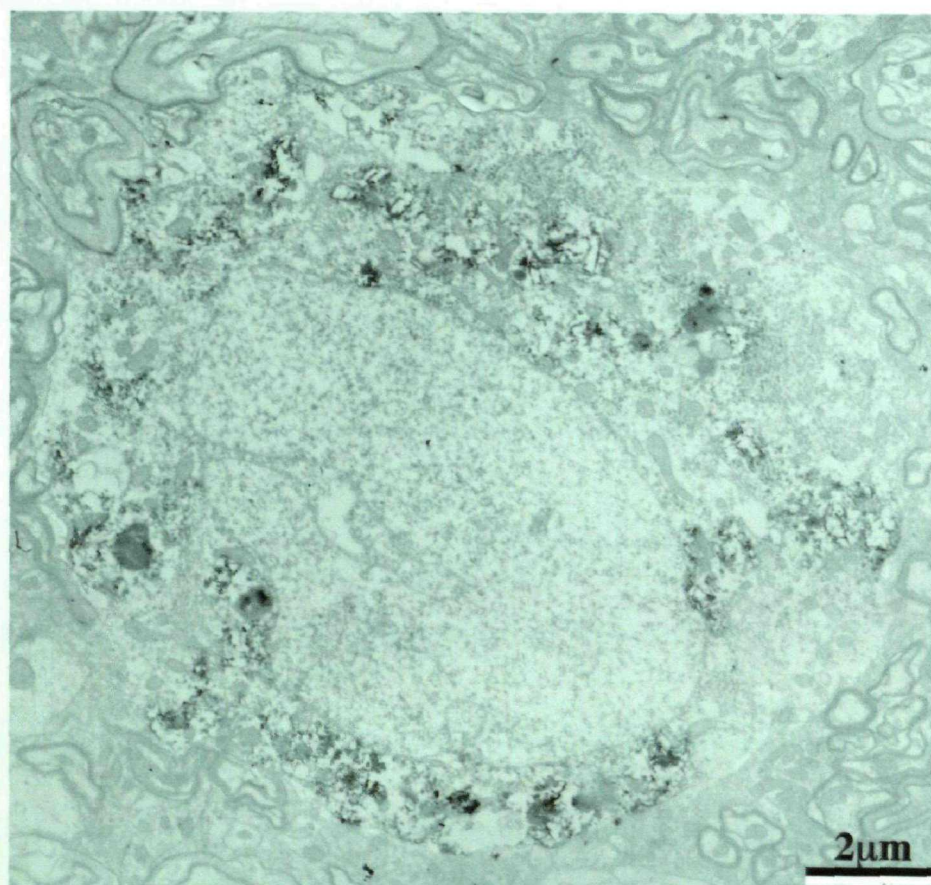
El cuerpo celular de las neuronas multipolares medianas (Figura 10) presentaba un citoplasma muy desarrollado con numerosos dictiosomas (unidades del aparato de Golgi), cuerpos de Nissl (agrupaciones de polirribosomas y cisternas de retículo endoplasmático rugoso generalmente en disposición paralela) y polirribosomas libres distribuidos por todo el cuerpo celular, abundantes mitocondrias y lisosomas. Su núcleo generalmente ovalado ocupaba una posición central o ligeramente excéntrica y tenía invaginaciones pequeñas de la membrana nuclear o carecía de ellas. El nucleolo era grande, denso o mostraba grandes espacios vacuolares (Figura 10A).

En las células bipolares pequeñas (Fig. 9C), el citoplasma que rodeaba al núcleo era escaso ya que la relación núcleo/citoplasma era superior a la observada en las células multipolares. Tenían pocos perfiles del aparato de Golgi y cuerpos de Nissl y la mayoría de los orgánulos estaban acumulados en ambos polos de la célula, donde el citoplasma era más abundante y donde se originaban las dendritas primarias que contenían los orgánulos del soma. A veces, la envoltura nuclear mostraba profundas invaginaciones y el nucleolo era oscuro con pequeños espacios vacuolares. Una gran parte de la membrana plasmática, que no recibía terminales nerviosas, solía estar rodeada por prolongaciones gliales astrocíticas muy delgadas o por fibras con mielina. El resto de las células estudiadas mostraban características ultraestructurales intermedias entre los tipos citados.

Con respecto a posibles características de interés por su posición en el neuropilo, en una de las neuronas (número 51) se encontró otra inmediatamente adyacente a la misma, si bien una fina prolongación glial separaba sus membranas y no se pudo apreciar unión GAP entre ellas (Fig. 11). También se encontraron oligodendrocitos seccionados a nivel somático y nuclear cubriendo parte de la membrana plasmática de cinco de las 17 neuronas marcadas estudiadas ultraestructuralmente: en dos de ellas (neuronas 2 y 12) existían dos oligodendrocitos adyacentes.



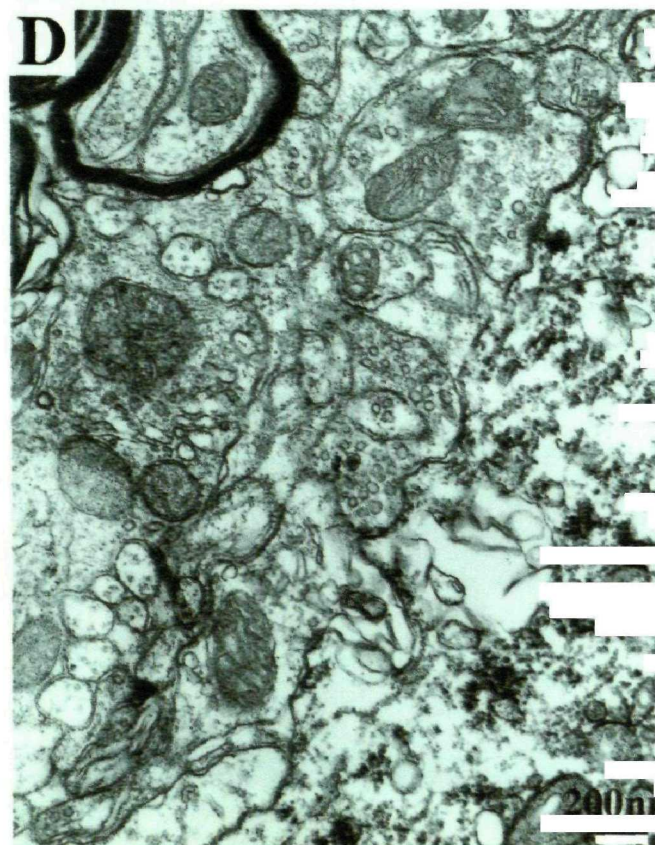
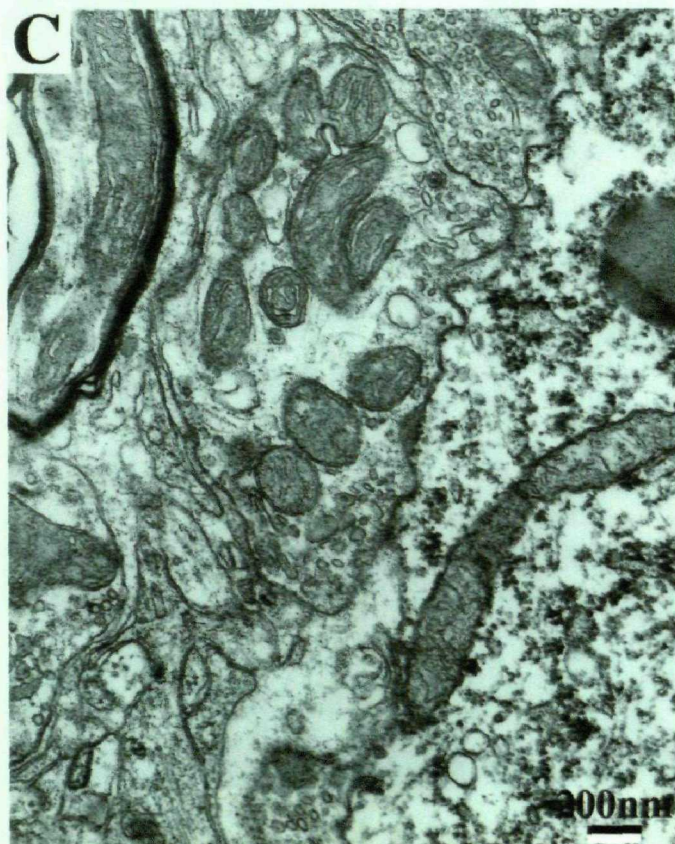
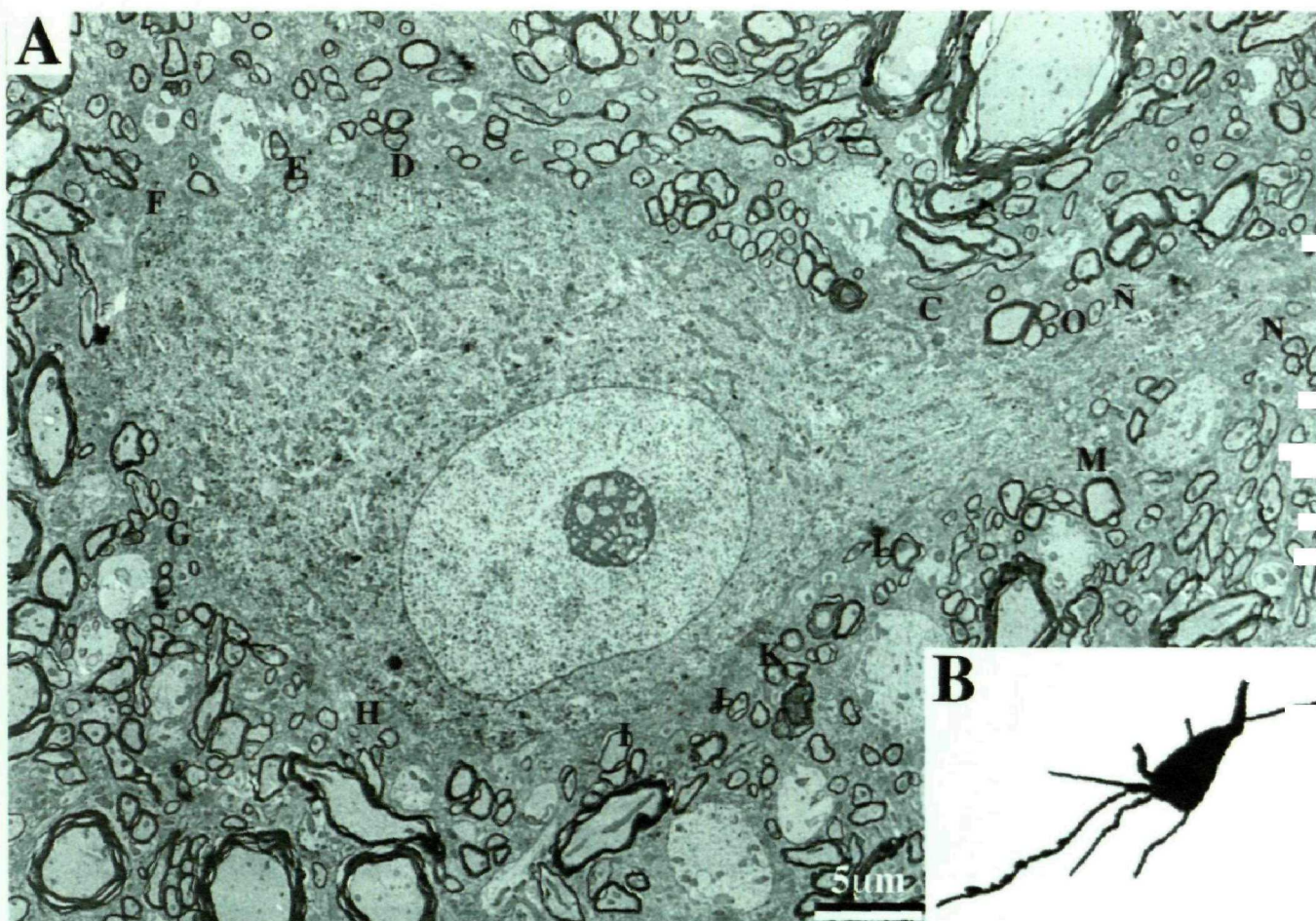
**Figura 9.** Ejemplos de neuronas del vRPO marcadas con peroxidasa retrógradamente desde RMc, visualizadas con el microscopio electrónico. **A:** Neurona número 12. Obsérvese la misma neurona a nivel de microscopía óptica (**B**) utilizando como orientación los vasos marcados con asteriscos. **C:** Microfotografía de la neurona 10; su imagen en el microscopio óptico en la figura **D**.

**A****B****C****D**

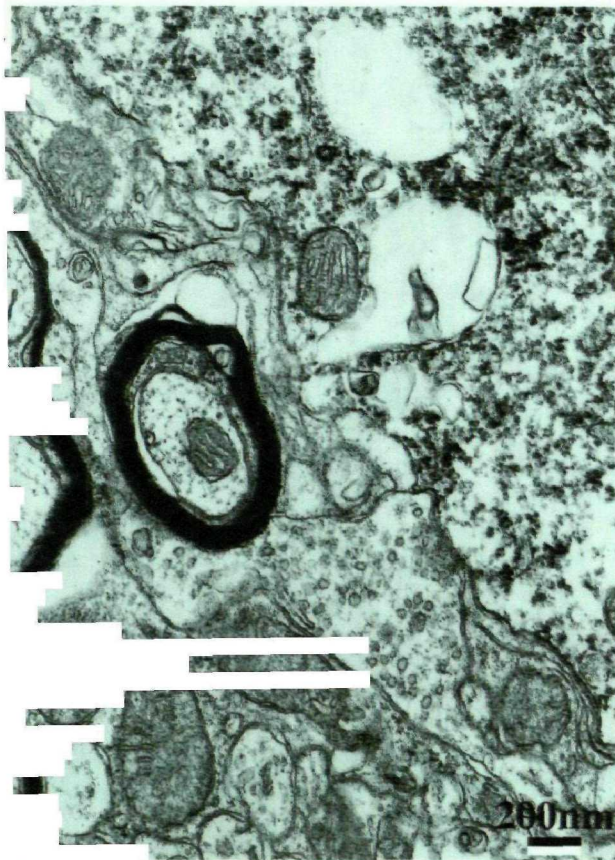
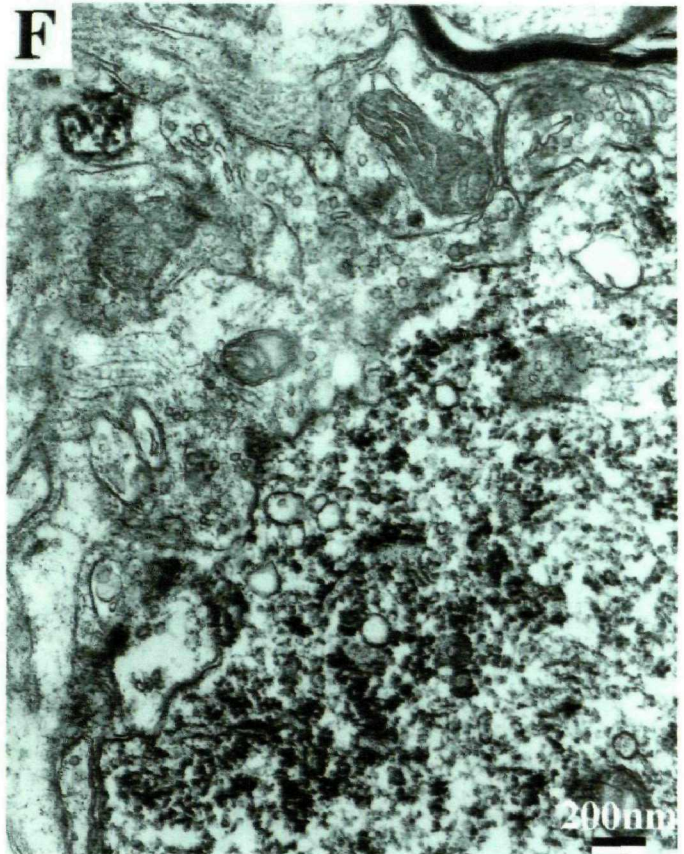
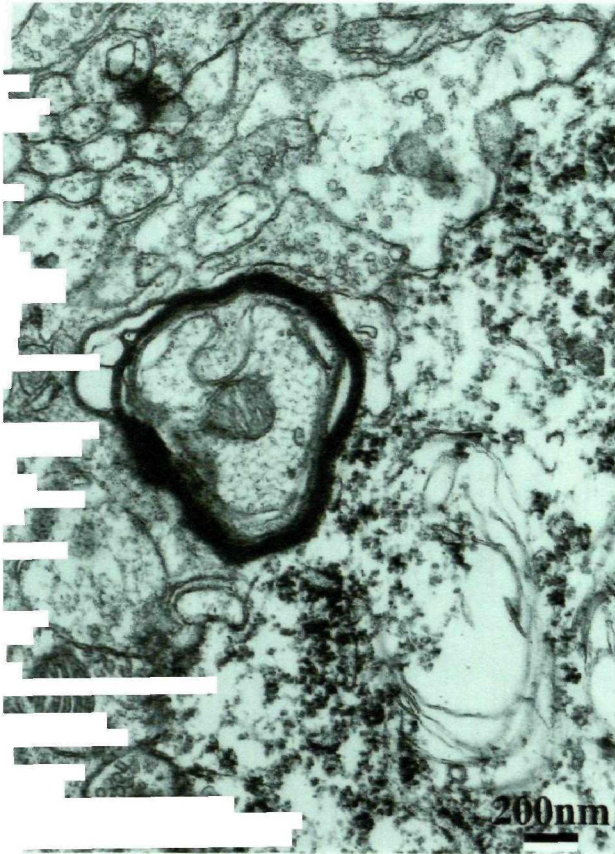


**Figura 10.** La figura **A** muestra a la neurona número 20 en una fotografía de microscopía electrónica a pequeño aumento, con el dibujo adyacente de la misma en cámara lúcida (**B**). La serie de imágenes **C** a **O** representan algunas de las diferentes terminales sobre la misma en este plano de corte observadas a mayor aumento.

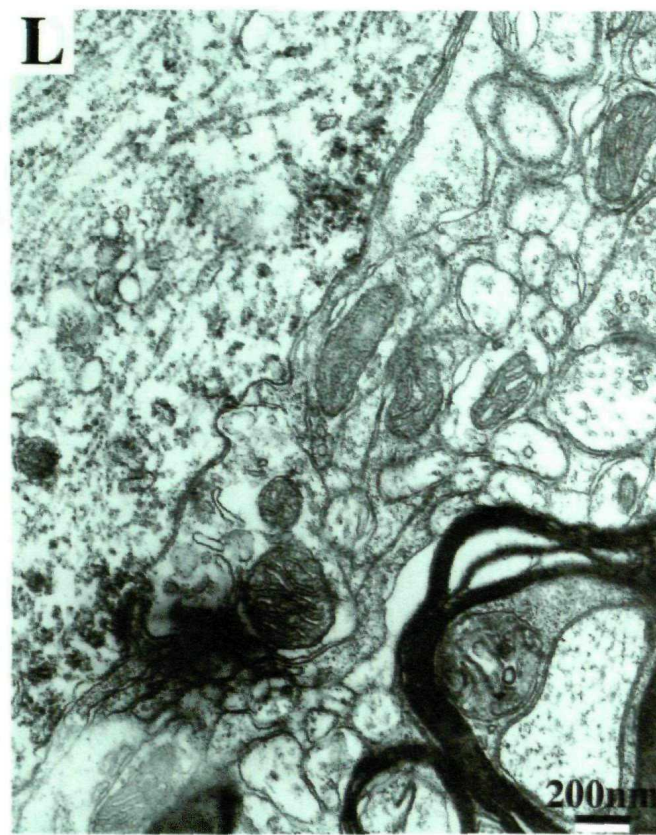
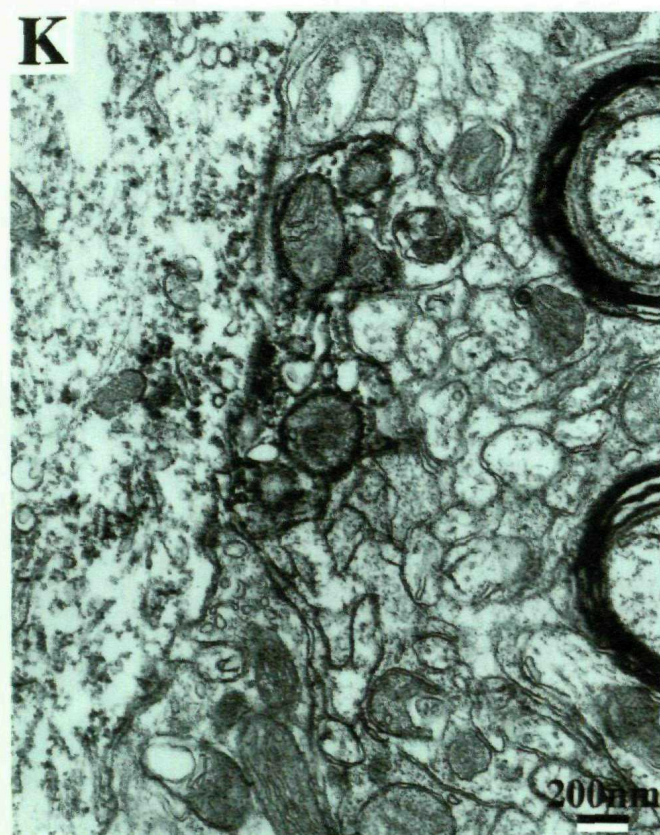
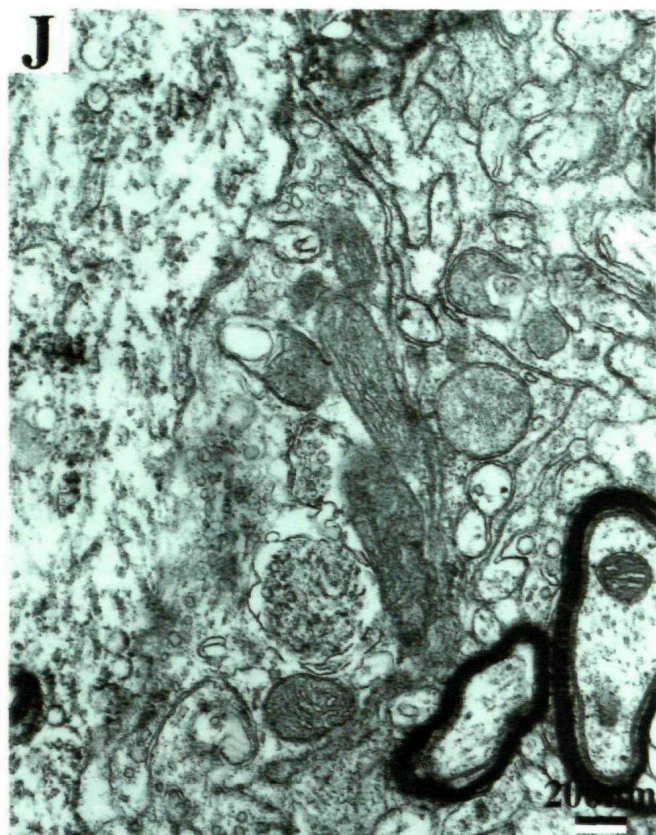
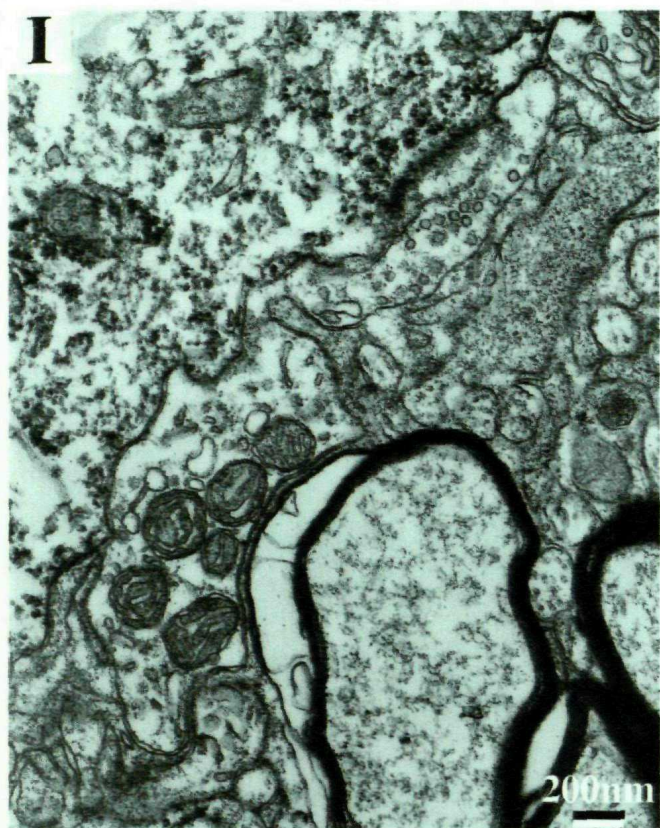




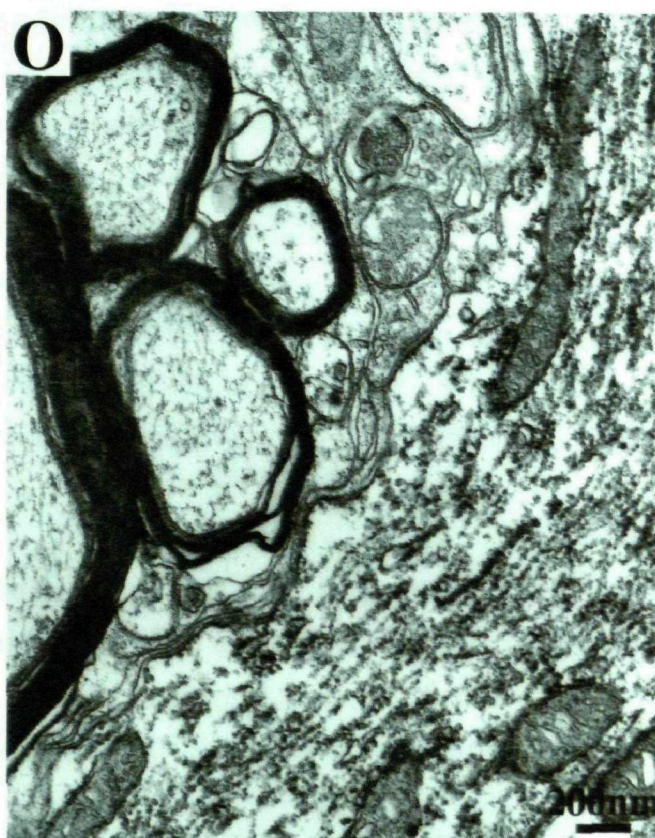
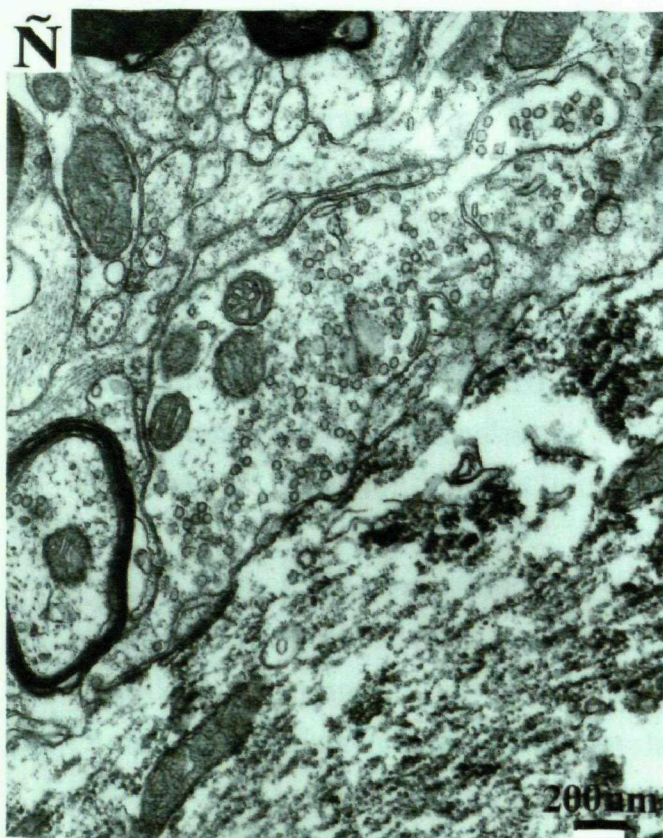
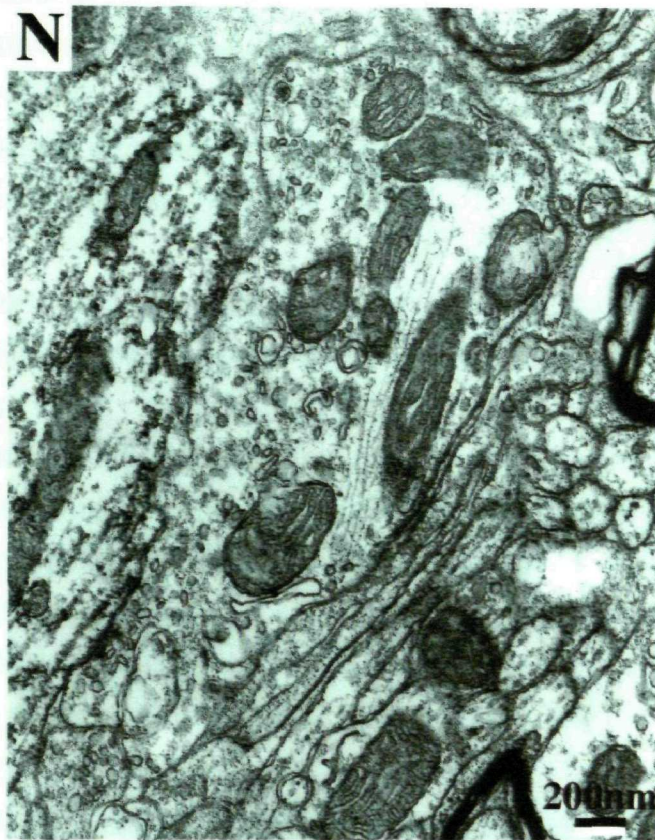
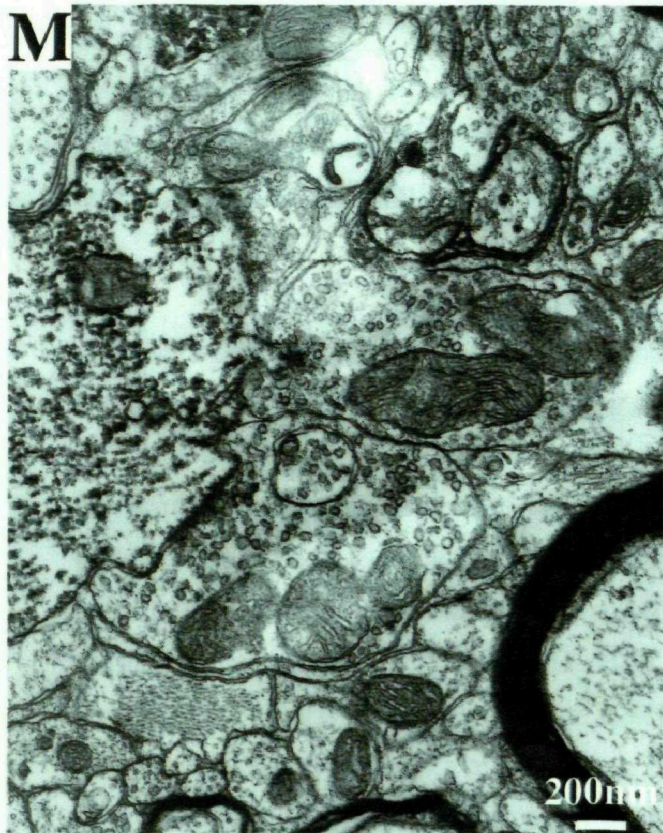














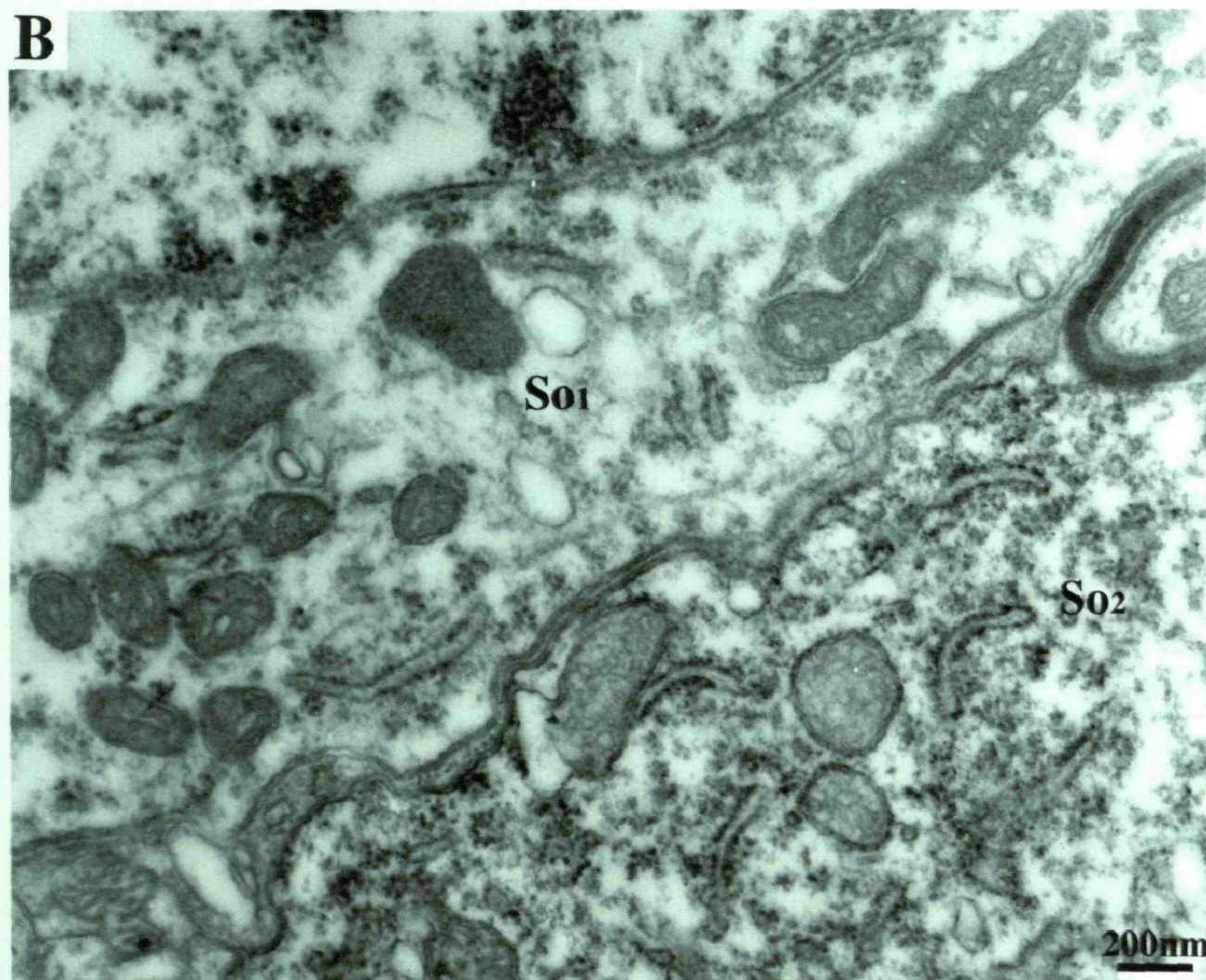
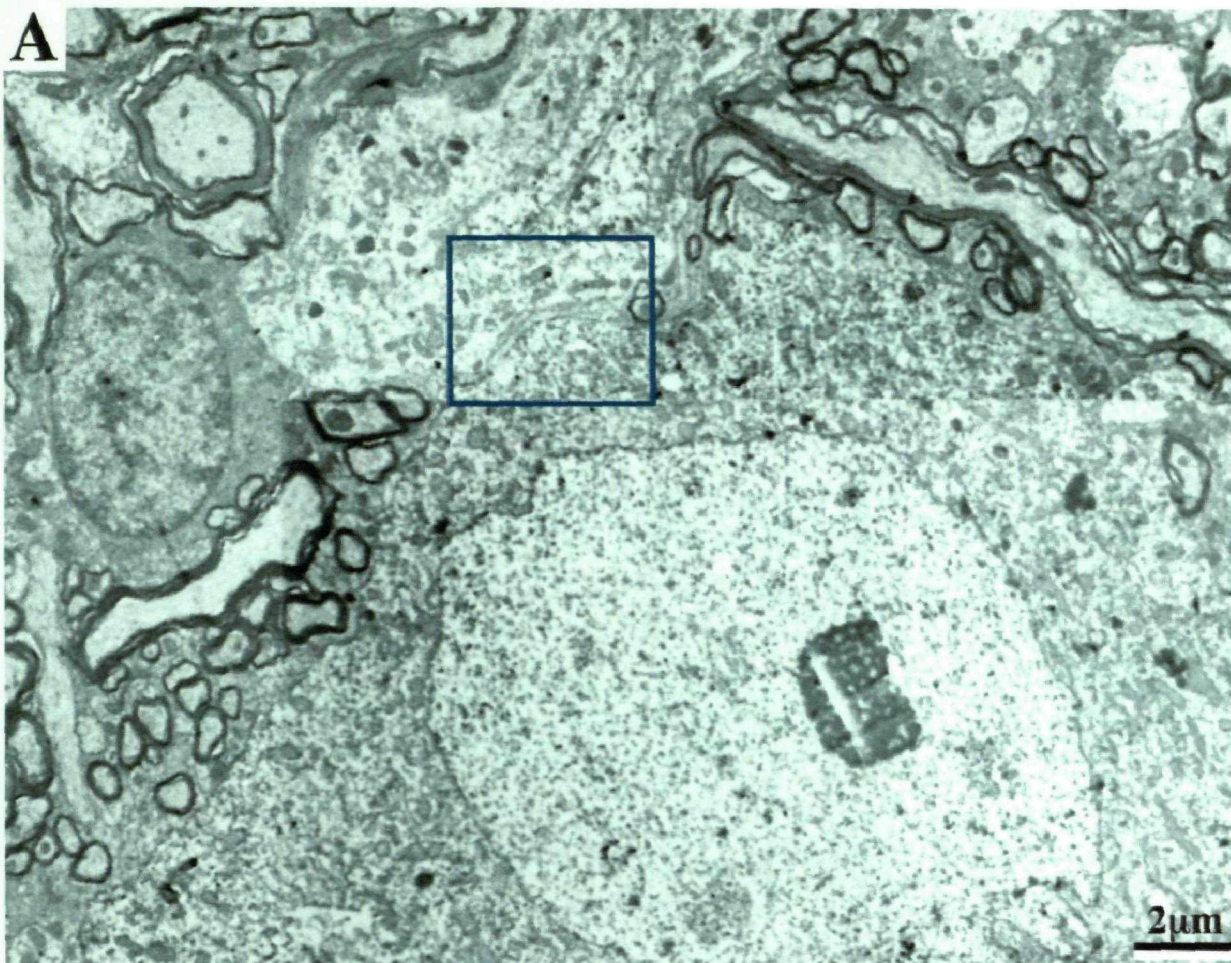
Se estudiaron un total de 482 terminales sobre soma y dendrita proximal de neurona marcada, 115 de ellas estableciendo contacto sináptico en el nivel de corte sobre alguno de los 17 cuerpos neuronales analizados ultraestructuralmente (secuencia de figuras 10.A a 10.O). En los casos en que una misma neurona se estudió en distintos niveles de corte, se evitó el análisis de una misma terminal en más de una ocasión dejando un espacio suficiente entre los cortes examinados. Las características ultraestructurales cuantitativas de estas terminales axónicas (Tabla 5) se describen a continuación.

**i. Aspecto general de la terminal:** 1. La forma de las terminales axónicas, aunque depende del plano de corte, fue generalmente de tendencia abovedada o alargada. Sin embargo, en el 41,1% de las terminales sobre soma y en el 53,5% de las terminales sobre dendrita proximal, las terminales mostraban una invaginación producida por terminales adyacentes, que estaban sobre la misma estructura postsináptica (Figura 10Ñ). A veces (4,3% y 8,1% en el caso de soma y de dendrita proximal respectivamente), la terminal tenía estructuras con vesículas rodeadas por una doble membrana, posiblemente procedentes de dichas invaginaciones (Figuras 10D, H y M). Aunque la mayoría parecían ser botones terminales, en varias ocasiones (en un 2,34% de las terminales sobre soma y en un 0,54% de las terminales sobre dendrita proximal), se observaron terminales *en passant* (Figura 12). Si bien al tratarse de un estudio en cortes no seriados, es posible que su número sea superior. Su unión con la estructura postsináptica era lineal, con pequeñas ondulaciones y sólo ocasionalmente se encontraron pequeñas invaginaciones hacia el citoplasma de la neurona postsináptica. También hay que destacar el hecho de que un 49,49% de las terminales sobre soma y un 40,98% de las terminales sobre dendrita proximal aparecieron rodeadas por glía y/o mielina evitando de este modo un posible contacto sináptico. 2. El valor medio del tamaño de las terminales fue menor de  $1\mu\text{m}^2$  en todos los tipos estudiados y no mostró diferencias significativas entre animales. Al agrupar los datos procedentes de todos los animales, la media de las áreas fue  $0,64\pm 0,45\mu\text{m}^2$  ( $n=479$ ) en el conjunto de las terminales. Considerando sólo las terminales que establecían sinapsis en el corte estudiado ( $n=115$ ) el valor medio del área fue  $0,73\pm 0,47\mu\text{m}^2$ .

**ii. Características internas de la terminal:** 1. Vesículas: El 61,7% de las terminales somáticas y el 68,8% de las dendríticas tenían una mayoría de vesículas sinápticas redondeadas y pequeñas (aproximadamente de 30-35nm de diámetro). El resto de las terminales tenían mayoría de vesículas ovaladas (33,4 y 29,5% de las terminales situadas en soma y dendrita respectivamente) o aplastadas (solamente se observaron en el 0,62% de las terminales somáticas). Ocasionalmente, algunas de estas terminales tenían escasas vesículas granulares de tamaño grande (70-75nm de diámetro). Dichas vesículas estaban en el 18,6% de las terminales con mayoría de vesículas redondeadas y el 15,5% de aquéllas con mayoría

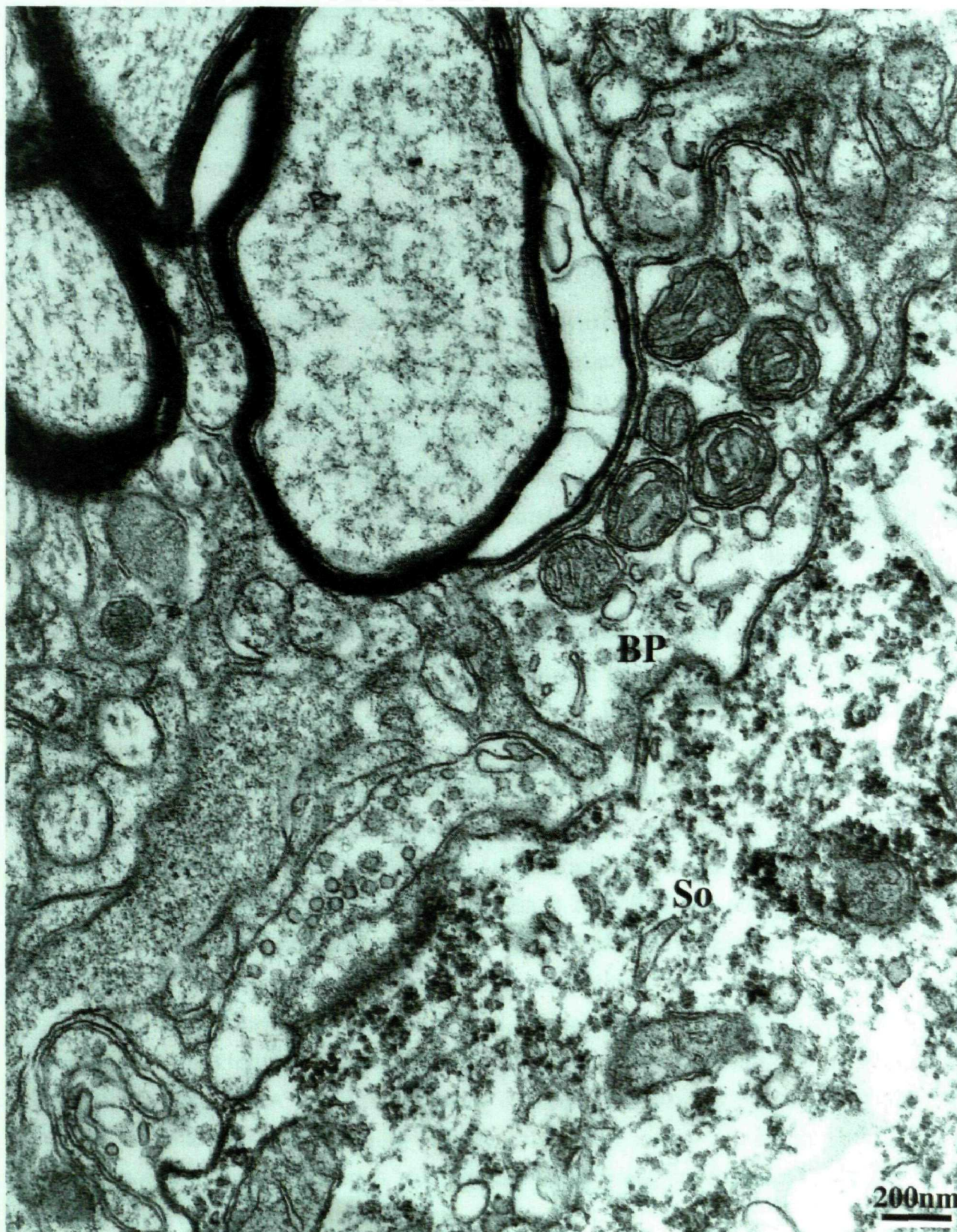
**Figura 11. A:** Microfotografía de la neurona 51 (So2), marcada retrógradamente desde RMc, que se encontró en proximidad a otra neurona no marcada (So1) como se puede apreciar en el detalle de la imagen **B** que corresponde a una ampliación del rectángulo señalado en **A** en una sección adyacente.





**Figura 12.** Ejemplo de terminal axónica sobre soma de neurona marcada (So) en que se evidencia en el plano de corte su naturaleza de botón *en passant* (BP)







de vesículas ovaladas. El número de vesículas sinápticas observado dentro de las terminales era muy variable. Las vesículas estaban dispersas por el citoplasma o formaban grupos junto a la zona activa. 2. Los valores medios del área mitocondrial y de su porcentaje relativo mostraron diferencias significativas entre gatos con distintos trazadores (G1155 y G1191 ó G1197). Teniendo en cuenta que el número de mitocondrias fue similar en estos animales y que se utilizaron diferentes fijadores con cada trazador, las diferencias citadas probablemente se deben a una reducción del tejido mitocondrial por el fijador. 3. Retículo endoplasmático: El 8,69% de las terminales sobre soma y el 15,30% de las terminales sobre dendrita proximal tenían cisternas de retículo endoplasmático. Ocasionalmente, se observaron neurofilamentos y cuerpos multivesiculares en las terminales axónicas.

**iii. Características de la unión entre la terminal y la neurona postsináptica:** No se encontraron diferencias significativas en la longitud de aposición y porcentaje de aposición de las terminales sobre soma y dendrita proximal, entre los tres gatos, aunque había una pequeña excepción. El valor medio de la longitud de aposición fue de  $1,19 \pm 0,59 \mu\text{m}$  ( $n=481$ ) en el conjunto de las terminales y de  $1,40 \pm 0,58 \mu\text{m}$  ( $n=115$ ) en las terminales que establecían sinapsis en corte estudiado. El porcentaje de aposición de la terminal (relación entre su longitud de aposición y su perímetro) da una idea aproximada de la forma que tiene la terminal y de su nivel de contacto. Su valor medio fue  $31,5 \pm 10,0\%$  en el conjunto de las terminales y  $34,6 \pm 8,8\%$  en aquéllas que formaban sinapsis.

Las terminales que formaban sinapsis representaban aproximadamente el 33,4% de las terminales localizadas sobre el soma y el 38,7% de las terminales sobre las dendritas proximales. Aunque el tipo de contacto sináptico era dudoso a veces, las dendritas proximales recibían aproximadamente un 28,41% de terminales asimétricas y un 8,74% de simétricas, mientras que el soma mostraba un 20,73% de terminales asimétricas y un 12,04% de terminales simétricas (Tabla 4). La zona activa en las terminales sinápticas tuvo una longitud media de  $0,22 \pm 0,09 \mu\text{m}$  ( $n=111$ ). En el 20,72% de las mismas se diferenciaba más de una zona activa, normalmente dos. En sólo el 3,84% de las terminales asimétricas se encontraron taxi bodies.

Además de las especializaciones sinápticas se encontraron uniones del tipo "punctum adhaerens" entre la terminal y la estructura postsináptica. Aunque trabajos previos relacionan los "punctum adhaerens" con las terminales de mayor tamaño, en el presente trabajo el tamaño de dichas terminales fue muy variable (entre  $0,10$  y  $1,74 \mu\text{m}^2$ ;  $n=12$ ). El porcentaje de terminales con "punctum adhaerens" fue del 2,34% en terminales sobre soma y del 4,91% en terminales sobre dendrita proximal.

**iv. Características de la estructura postsináptica:** Si bien en el 49,79% de las terminales estudiadas no se encontraron orgánulos postsinápticos, el resto mostró

una gran variedad de los mismos. Los orgánulos postsinápticos observados fueron: mitocondrias (25,1%), retículo endoplasmático rugoso (6,84%), vacuolas (4,77%), vesículas (4,56%) y lisosomas (1,86%). En un 6,84% de las terminales aparecían dos orgánulos adyacentes, siendo normalmente uno de ellos una mitocondria.

En un bajo número de ocasiones las terminales hacían contacto sobre una espina somática, y en el 3,01% de las terminales somáticas y en el 1,09% de las ubicadas sobre dendrita proximal la terminal axónica se encontraba simultáneamente adyacente a dos estructuras postsinápticas.

Finalmente, hay que destacar que se encontraron 9 terminales marcadas (las figuras 10K, 13 y 14A corresponden a algunas de ellas) sobre las neuronas marcadas retrógradamente (5 sobre soma y 4 sobre dendritas) y algunas de ellas formaban contactos sinápticos. El diámetro de los somas y dendritas que recibían las terminales marcadas era muy variable y la forma de la neurona postsináptica podía ser multipolar (número 20) o bipolar (neurona 21). Una de estas neuronas (la neurona 52) recibía dos terminales marcadas en dos planos de corte, distantes entre sí más de 6µm (pudimos identificar que no se trataba de la misma terminal debido a que existían planos intermedios de corte en que no aparecía ninguna terminal marcada, además de por su diferente posición en el perímetro somático). Las terminales marcadas solían estar rodeadas por prolongaciones gliales y tenían diferentes formas, tamaños (área: 0,13-1,24µm<sup>2</sup>), porcentajes de área mitocondrial (0%-57,1%) y longitudes de aposición. La forma de sus vesículas solía ser redondeada (sólo una de las terminales sobre soma tenía principalmente vesículas ovaladas), el contacto sináptico en la mayoría de los casos parecía simétrico y ocasionalmente tenían estructuras citoplasmáticas (con o sin vesículas) rodeadas por dos membranas.

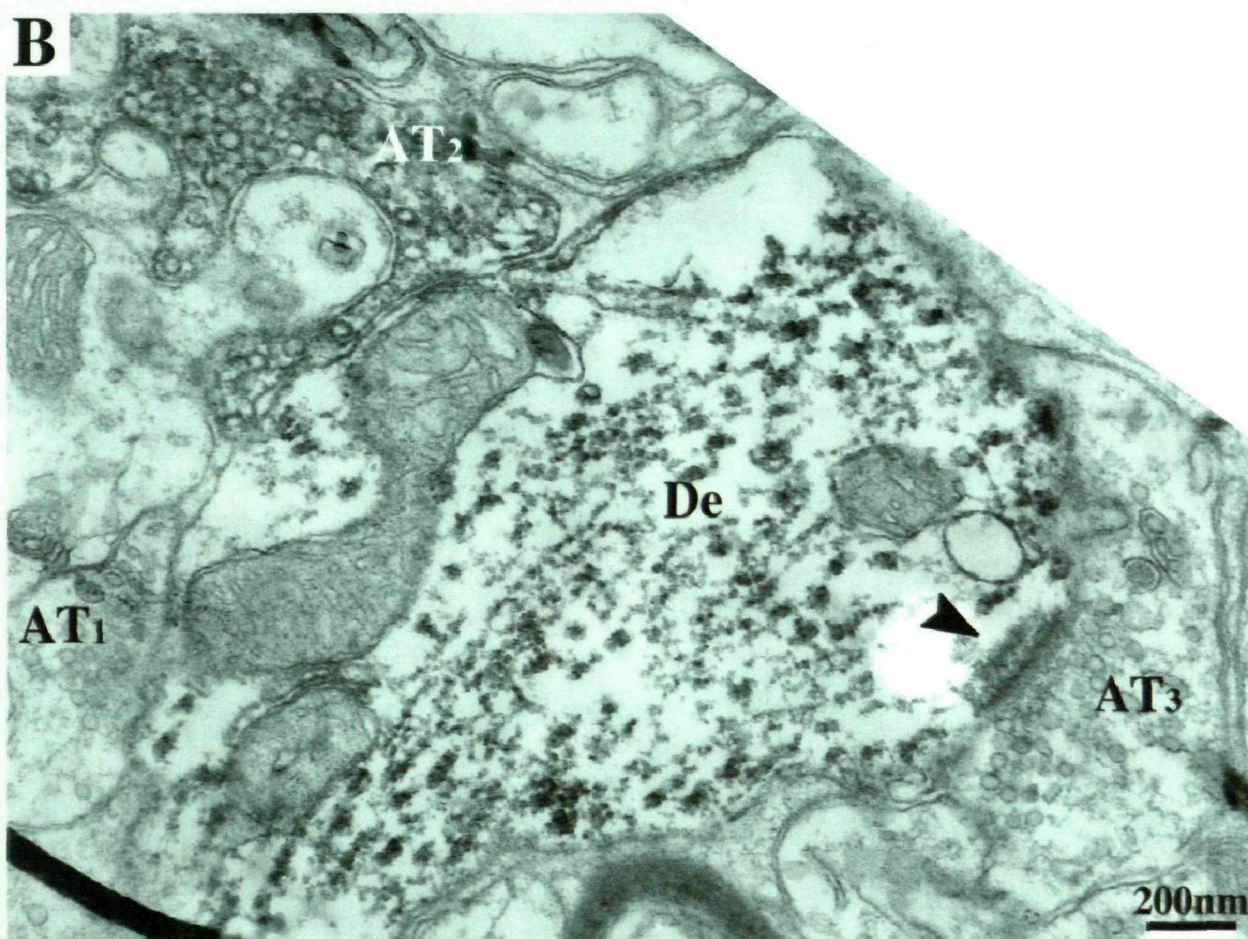
## 1.2. Dendrita del neuropilo

Debido a que el precipitado de HRP-WGA se localiza principalmente en soma y dendrita proximal, el material de este estudio procede de los dos gatos con inyecciones de BDA, ya que en estos casos el trazador se localizaba en todo el árbol dendrítico, incluyendo dendritas distales.

Las dendritas marcadas recibían un número variable de terminales nerviosas por 100µm de membrana (frecuencia), que solía ser más alta en las dendritas proximales: en algunas de las dendritas proximales marcadas (diámetro mayor de 2µm y abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso) la frecuencia de terminales nerviosas era muy alta. Las terminales se caracterizaban por su diversidad morfológica y a veces emitían prolongaciones citoplasmáticas hacia las terminales próximas. Aunque algunas dendritas distales estaban

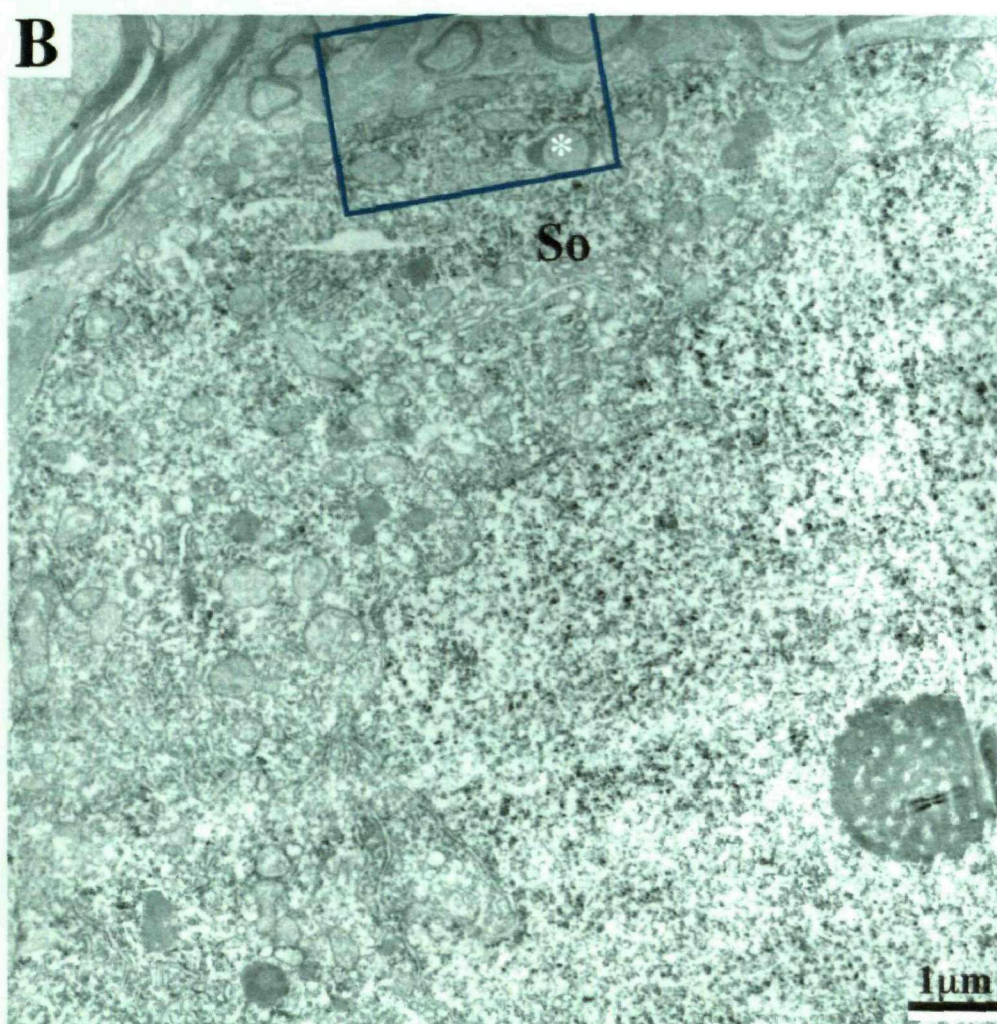
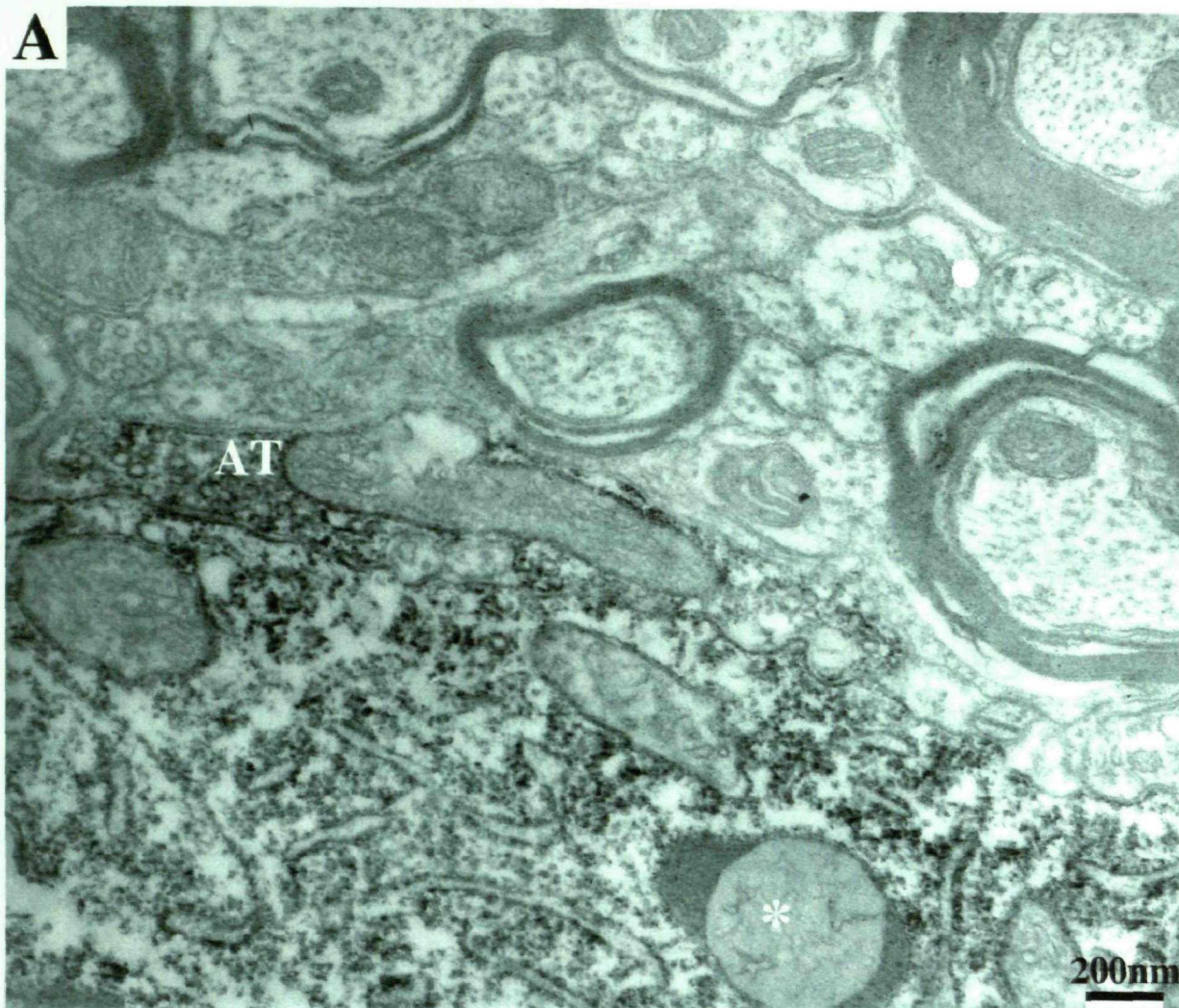
**Figura 13.** Terminales marcadas con BDA adyacentes a dendritas en neuropilo igualmente marcadas con trazador (De). **A:** Obsérvese cómo el axón terminal marcado (AT5) empieza a envolver (asterisco en blanco) una parte de la terminal no marcada adyacente (AT4, asterisco en negro). Apréciense también la estructura no marcada con vesículas que se encuentra a su vez en el interior de AT5 y préstese atención igualmente al elevado número de terminales no marcadas (AT1 a AT4) que recibe la dendrita (De). **B:** La terminal marcada (AT2), adyacente a dendrita marcada (De), muestra profundas invaginaciones de su membrana, producidas por las estructuras adyacentes. Observamos de nuevo en esta ocasión cómo la dendrita marcada recibe también información desde otras terminales no marcadas (AT1 y AT3). La punta de flecha indica una sinapsis de tipo asimétrico.



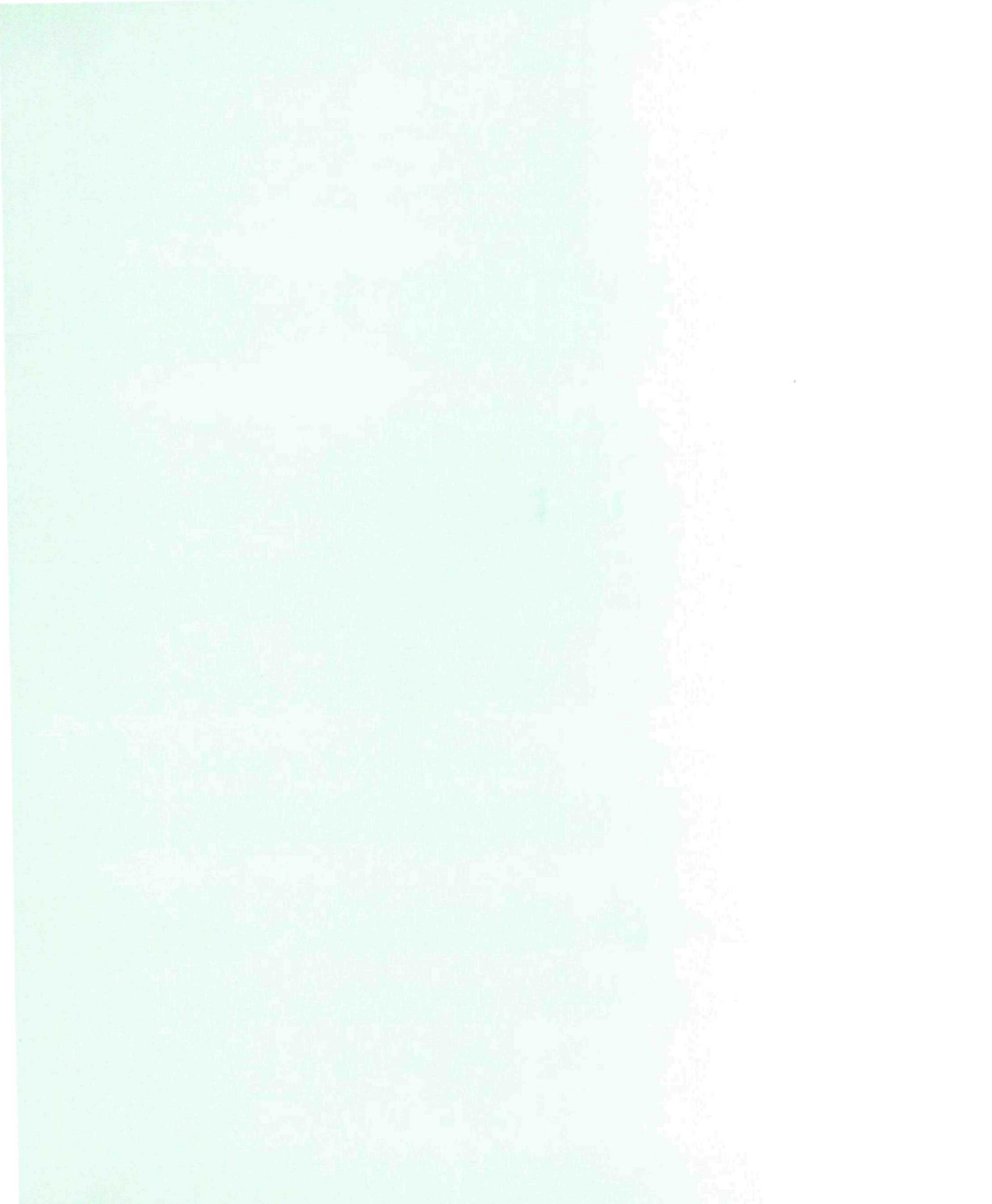


**Figura 14.** Terminal axónica marcada con BDA (AT) que establece sinapsis con el soma de la neurona 52 (So), igualmente marcada con BDA. La imagen **A.** representa el detalle de este contacto sináptico (ampliación del rectángulo dibujado en **B.** el lisosoma marcado con un asterisco sirve como referencia).









**Figura 15.** Terminal axónica en relativa proximidad a dendrita marcada (De), pero nótese la delicada prolongación glial (marcada con asteriscos a ambos lados de la aposición aparente entre terminal y dendrita) que evita la aposición efectiva entre las membranas de ambas estructuras.







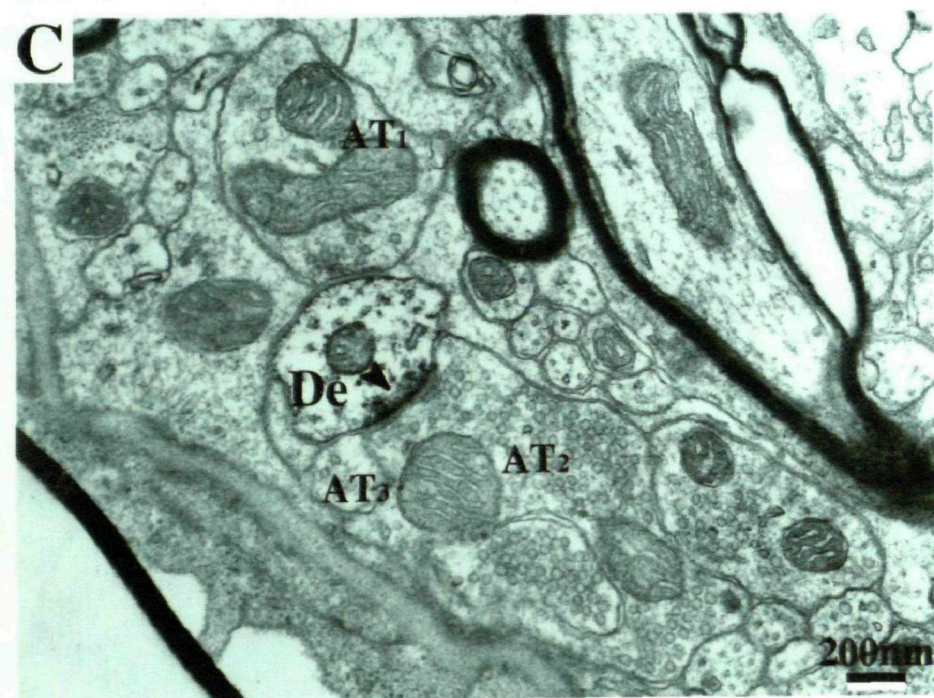
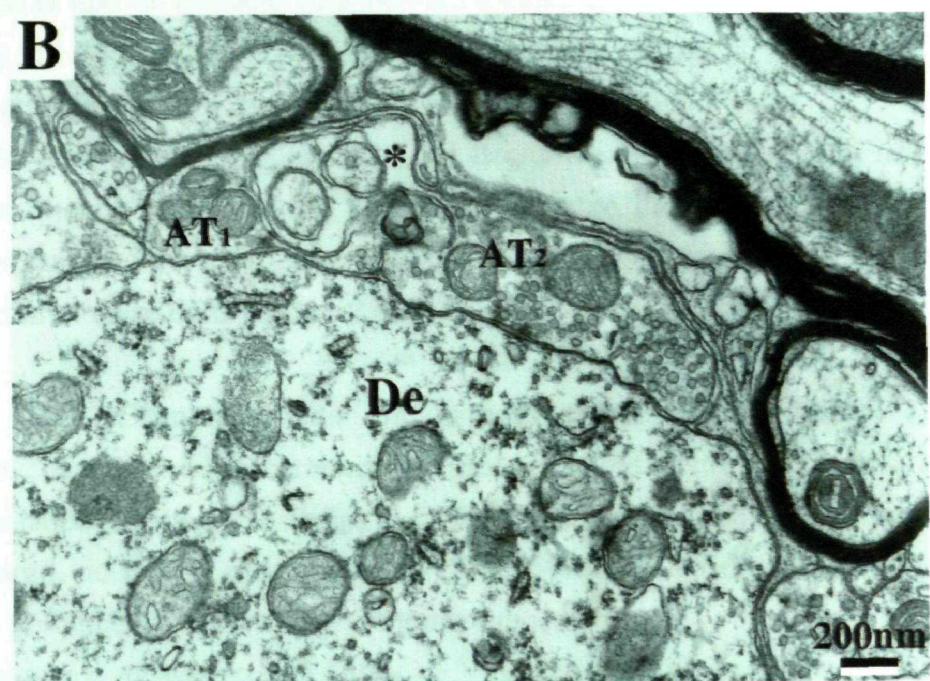
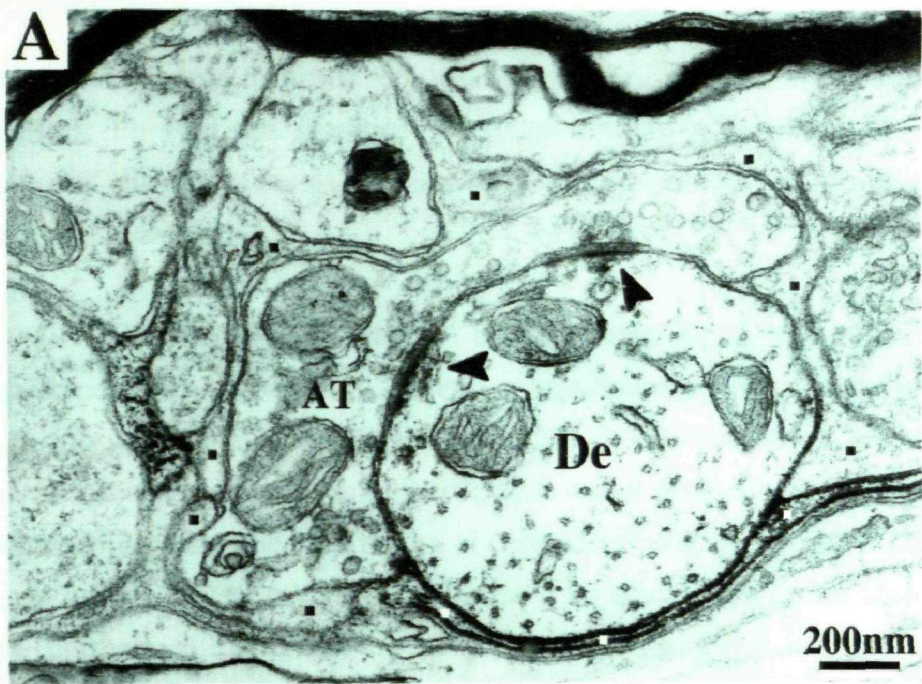
rodeadas casi por completo por una o más terminales (Fig. 16C), otras estaban completamente rodeadas por glía y por lo tanto no recibían ninguna terminal. Al agrupar todos los datos recogidos en las dendritas del neuropilo se vio que el 42,86% de la membrana dendrítica analizada estaba cubierta por terminales, y el número de terminales por cada 100µm de membrana era 44,78 en G1191 y 56,77 en G1197. Estos valores medios son superiores a los observados en la mayoría de los cuerpos celulares, indicando que la frecuencia de terminales nerviosas es mayor sobre las dendritas. Se estudiaron un total de 253 terminales sobre dendrita marcada en neuropilo, de ellas 65 establecían sinapsis en el nivel de corte. Se dejó un espacio suficiente entre las secciones estudiadas para evitar un posible estudio repetido de una misma terminal axónica.

**i. Aspecto general de la terminal:** La forma era abovedada o alargada. En su mayoría parecían ser botones terminales, sólo en cuatro ocasiones la unión entre dos botones evidenció su naturaleza de *bouton en passant*. Su unión con la estructura postsináptica era generalmente lineal, con pequeñas ondulaciones. Ocasionalmente, se vieron invaginaciones entre terminales adyacentes (4,74% de las terminales). Además, en el 9,09% de las terminales se observaron estructuras redondeadas con vesículas, separadas del citoplasma por dos membranas. El 58,1% de las terminales estaban rodeadas por otras terminales y el 32,4% por glía y/o mielina. 2. En cuanto al tamaño de la terminal, no se encontraron diferencias significativas entre los gatos estudiados. Al agrupar todos los resultados obtenidos, la media de su área fue  $0,69 \pm 0,54 \mu\text{m}^2$  en la población total de terminales (n=253). Cuando sólo consideramos las terminales formando sinapsis en el corte estudiado (n=65) la media fue  $0,75 \pm 0,51 \mu\text{m}^2$ . El 93,8% de las terminales con sinapsis midió menos de  $1,57 \mu\text{m}^2$ .

**ii. Características internas de la terminal:** 1. Vesículas: El 73,6% de las terminales tenía una mayoría de vesículas claras redondeadas, pequeñas (con un diámetro aproximado de 30-35nm) y solían formar sinapsis asimétricas (Fig. 16A); mientras que el 22,04% mostraba una mayoría de vesículas ovaladas y cuando formaban una sinapsis, su contacto era generalmente simétrico. Ambos tipos de terminales (el 26,73% de las primeras y el 14,28% de las segundas) tenían escasas vesículas granulares (70-75nm de diámetro, aproximadamente). El número de vesículas variaba, desde terminales con una alta densidad de vesículas (Fig. 16B) hasta aquéllas con pocas vesículas, dispersas o agrupadas junto a la membrana (Fig. 16A). 2. Mitocondrias: En este caso, no se encontraron diferencias significativas en las áreas mitocondriales y porcentajes de área mitocondrial entre los gatos estudiados. 3. Retículo endoplasmático: En el 16,9% de las terminales aparecían cisternas de retículo endoplasmático sin que en ningún caso se diferenciaron ribosomas que pudieran identificarlas como dendritas presinápticas. 4. Neurofilamentos: Sólo en el 1,58% de las



**Figura 16.** Axones terminales estableciendo contacto sináptico sobre dendritas marcadas (De). Obsérvese en la imagen **A** la glía (señalada con cuadrados negros) que circunda completamente al axón en el plano de corte, así como la fina prolongación glial (cuadrados blancos) que separa a la dendrita marcada (sobre la que la terminal, AT, establece sinapsis) de la dendrita adyacente. En la imagen **B** es de destacar la prolongación (marcada con un asterisco) de una de las terminales (AT2) sobre el axón adyacente. La figura **C** muestra una dendrita marcada distal, sobre la que se encuentran tres terminales (AT1, AT2 y AT3). Las puntas de flecha señalan sinapsis de tipo asimétrico.



terminales sobre dendrita marcada en neuropilo aparecían neurofilamentos. 5. Cuerpos multivesiculares: En sólo dos ocasiones se vieron cuerpos multivesiculares. 6. En cuatro ocasiones, todas ellas procedentes del caso G1191, aparecieron "inclusiones filiformes" a nivel de la terminal axónica.

**iii. Características de la unión entre la terminal y la dendrita postsináptica:** No se encontraron diferencias significativas entre los gatos respecto a la longitud de aposición ni al porcentaje de aposición de las terminales. Las medias de las longitudes de aposición fueron de  $0,92 \pm 0,58 \mu\text{m}$  en el conjunto de las terminales y de  $1,02 \pm 0,56 \mu\text{m}$  en aquéllas con sinapsis en el corte estudiado. El porcentaje de aposición en estas últimas fue de  $24,2 \pm 9,69 \mu\text{m}$ , encontrándose en un 10,76% de los casos más de una zona activa (normalmente dos) .

Aunque el tipo de contacto sináptico era dudoso en algunos casos, aproximadamente el 5,84% y el 24,56% de las terminales formaban sinapsis simétricas y asimétricas respectivamente en G1191 y el 8,53% y el 29,26% en G1197.

También se encontró que el 1,58% de las terminales tenían uniones del tipo punctum adhaerens (menor frecuencia que en terminales sobre dendrita proximal marcada). Estas terminales tampoco parecían estar relacionadas con alguna característica diferencial, y sus áreas oscilaron entre 0,20 y  $2,2 \mu\text{m}^2$ ,  $n=4$ ).

**iv. Características de la estructura postsináptica:** Los orgánulos postsinápticos encontrados fueron mitocondrias (22,52% de los casos), cisternas de retículo endoplasmático (8,30%) y vesículas (3,55%); a veces, se encontraron lisosomas o vacuolas. Sin embargo, no fueron encontrados en el 53,75% de los casos. Cuando había más de un orgánulo postsináptico, uno de ellos era una mitocondria.

En algunas ocasiones (3,55% de los casos) la terminal establecía relación simultáneamente sobre dos estructuras postsinápticas. Ocasionalmente, algunas terminales estaban marcadas anterógradamente como se señaló en el punto anterior. En la figura 13 se muestran algunos ejemplos.



## 2. ESTUDIO DE LAS TERMINALES MARCADAS ANTERÓGRADAMENTE

Los objetivos de este análisis son: caracterizar morfológicamente a las terminales nerviosas procedentes del RMc, conocer su distribución sobre el soma y las dendritas de las neuronas del vRPO e identificar el tipo de relaciones establecidas entre dichas terminales y el neuropilo del vRPO. El material de este estudio procedía de los animales G1191 y G1197 inyectados con BDA.

Las terminales marcadas con BDA fueron fácilmente identificadas por la presencia de un precipitado electrónicamente denso, difusamente distribuido alrededor de sus orgánulos (vesículas, mitocondrias, cisternas) y junto a la membrana plasmática. Debido a la presencia de este precipitado, la identificación del tipo de vesículas o de sinapsis era frecuentemente difícil. Hay que señalar que la intensidad del marcaje fue variable.

### 2.1. Terminales marcadas localizadas sobre soma y dendrita proximal

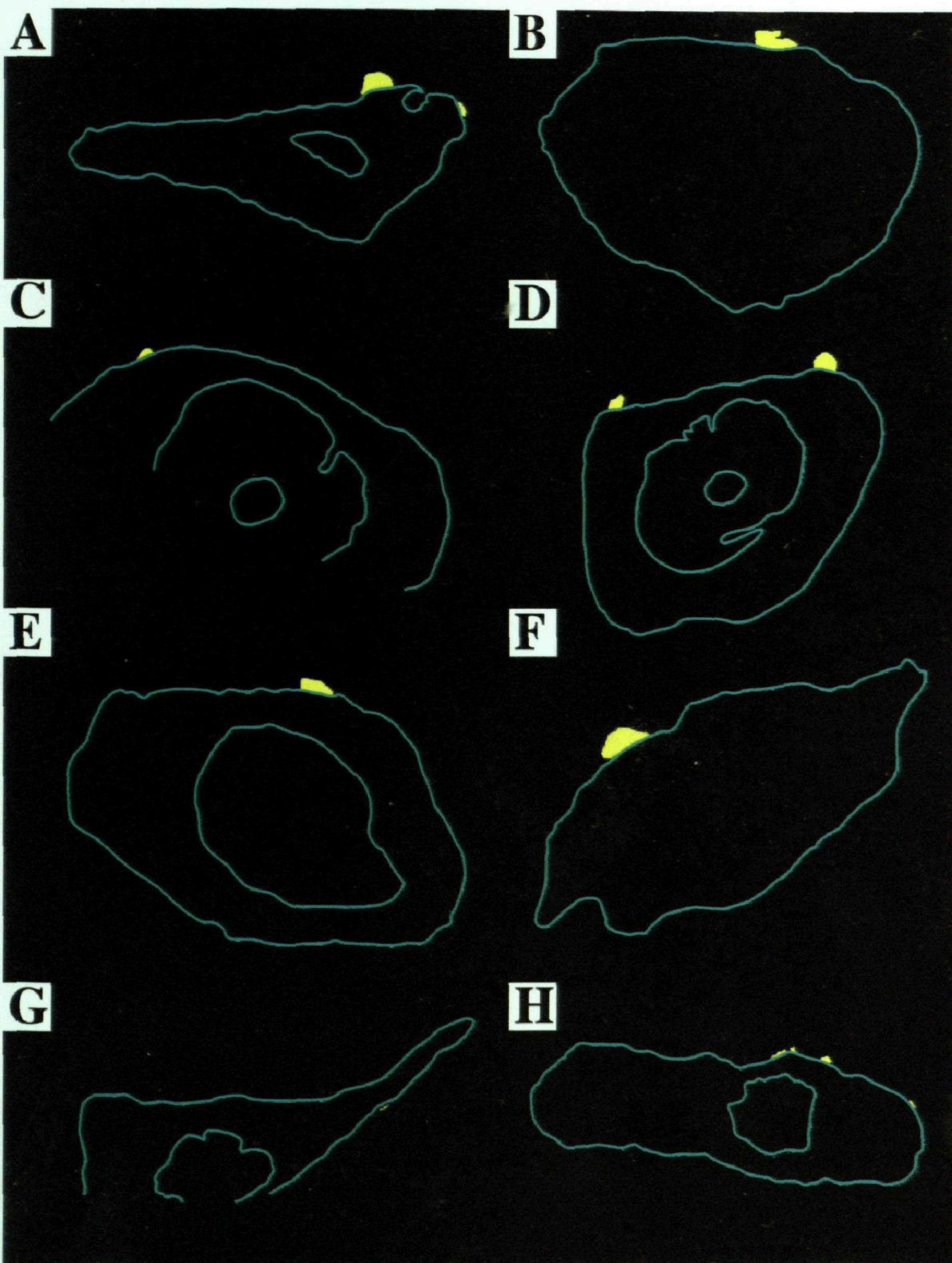
El estudio ultraestructural mostró sólo 10 cuerpos neuronales no marcados que recibían una o más terminales con BDA (Figs. 17, 18, 19, 20 y 21) y por lo tanto, el número total de terminales somáticas marcadas (18) fue pequeño. Estas neuronas mostraron un tamaño variable; concretamente sus diámetros, a nivel del núcleo, oscilaron entre 45,3 y 15 µm de diámetro mayor y 18,4 y 7,5 µm de diámetro menor. Aunque la forma de la neurona era a veces difícil de identificar, algunos de los perfiles observados sugieren la presencia de neuronas de ambas clases bipolar y multipolar.

Algunas de las terminales marcadas estaban próximas entre sí (Fig. 17H) por lo que podrían pertenecer a un solo axón terminando como *bouton en passant*. En otros casos las terminales marcadas estaban distantes (Fig. 17D), mostrando que una misma neurona puede recibir modulación desde distintas terminales axónicas en distintas zonas de su membrana (al menos sobre soma y dendrita proximal). Algunas de las neuronas que recibían terminales marcadas, mostraban una alta frecuencia de terminales no marcadas sobre su soma y dendrita proximal (Fig. 18). La figura 17 muestra una representación gráfica de algunas de las neuronas que recibían terminales marcadas y la disposición de éstas sobre las mismas.

Las características ultraestructurales cuantitativas de estas terminales aparecen en la tabla 6.

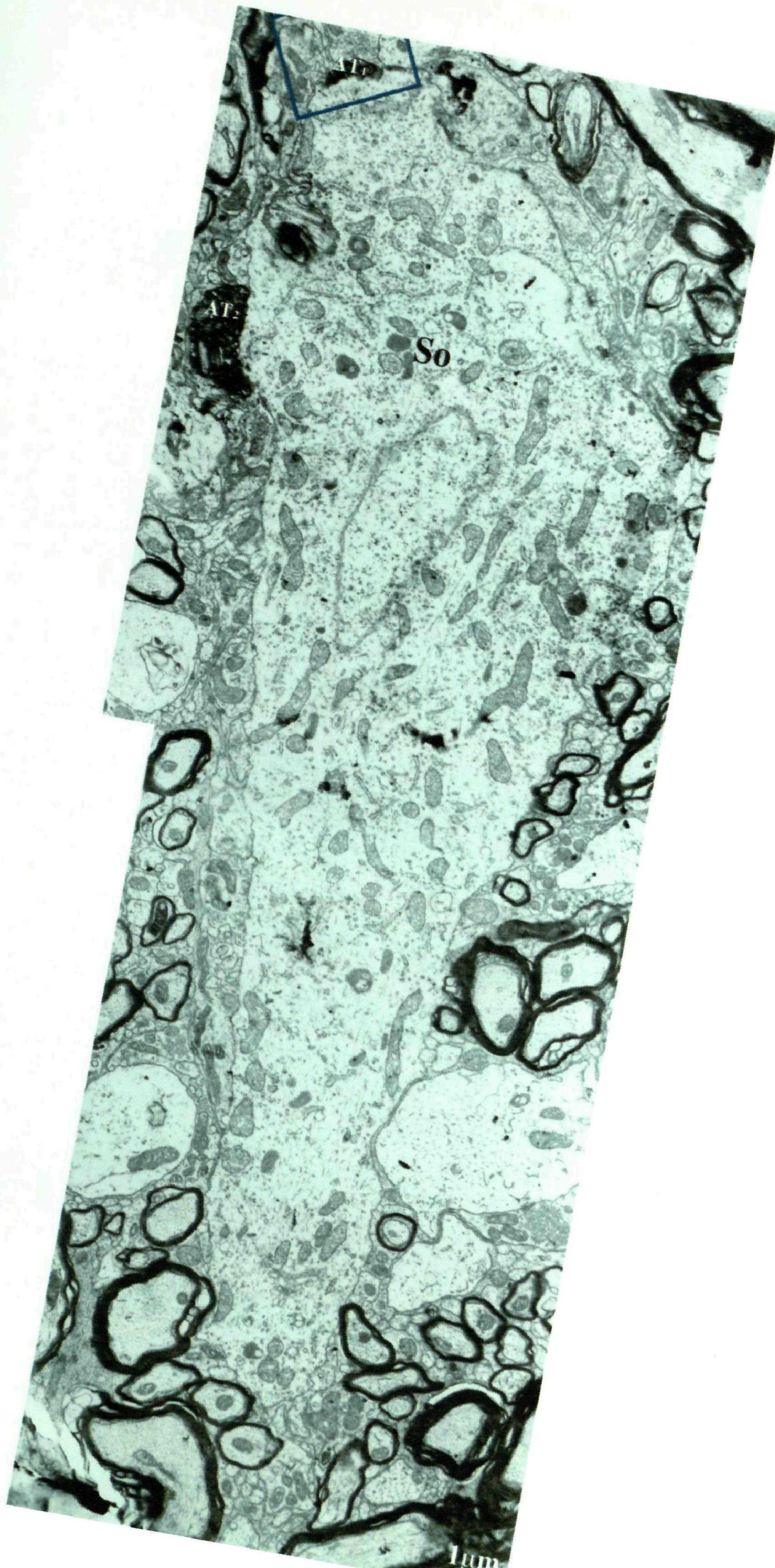
**i. Aspecto general de la terminal:** Las terminales axónicas marcadas tenían generalmente forma abovedada (una de las excepciones la mostramos en la sección de la figura 22) y su unión con la estructura postsináptica era de tendencia lineal, aunque a veces presentaba ondulaciones hacia su citoplasma. Ocho de las 17 terminales analizadas mostraron terminales no marcadas adyacentes. Una de las terminales parecía recibir un contacto de tipo

**Figura 17.** Representación gráfica a partir de imágenes tomadas en el microscopio electrónico de algunas neuronas del vRPO, (trazadas en azul), que recibían terminales marcadas (en amarillo) y la disposición de éstas sobre las mismas.





**Figura 18.** Neurona que recibe a nivel de soma (So) dos terminales axónicas marcadas con BDA (AT1 y AT2). La terminal AT1 se puede observar en detalle (marcado con recuadro) en la figura 19.



**Figura 19.** Detalle de la terminal AT1 de la figura 18, marcada con BDA, adyacente a neurona del vRPO (So). Obsérvese cómo la terminal no marcada AT2 parece establecer un contacto sináptico (señalada con flecha transparente la aposición de membranas en paralelo con AT1).





axoaxónico, como puede verse en la figura 19. Aunque el tamaño medio de estas terminales era menor de  $1\mu\text{m}^2$  (Tabla 6), sus valores fueron muy variables.

**ii. Características internas de la terminal:** 1. Vesículas: En los casos en que éstas se podían apreciar con nitidez, a pesar del trazador acumulado en la terminal, predominaban las vesículas claras redondeadas pequeñas (61,53%); en un 38,46% de los casos la forma de las vesículas parecía ovalada. Sin embargo, en ningún caso pudieron distinguirse vesículas granulares grandes. 2. Mitocondrias: El estudio cuantitativo de sus valores mostró una alta variabilidad. La tabla 6 muestra las medias de los datos procedentes de los dos animales estudiados. 3. Retículo endoplasmático: En varias de las terminales aparecían cisternas de retículo endoplasmático sobre las que ocasionalmente se observaron ribosomas (Fig. 23B), demostrando su naturaleza dendrítica. Estas terminales solían presentar escasa cantidad de trazador que podría deberse a su origen: una vez que el trazador llega retrógradamente a un soma, en el vRPO, sería transportado anterógradamente hacia las terminales dendríticas.

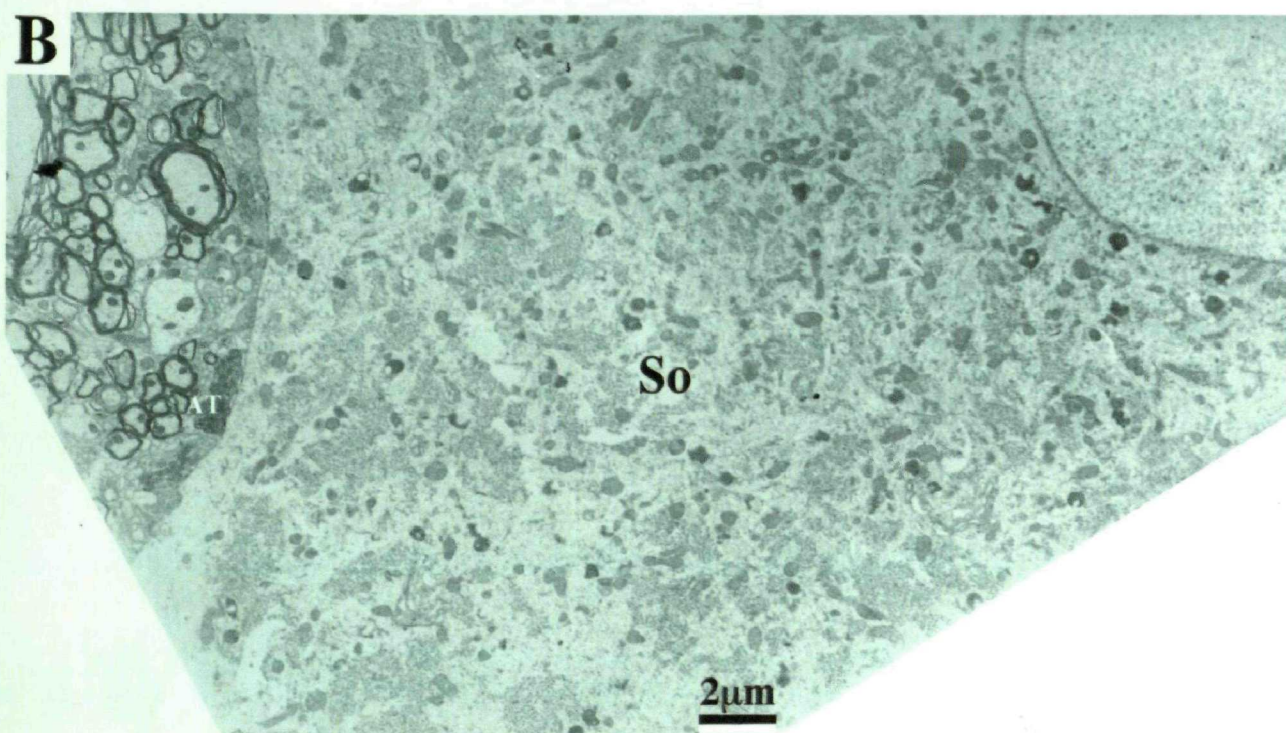
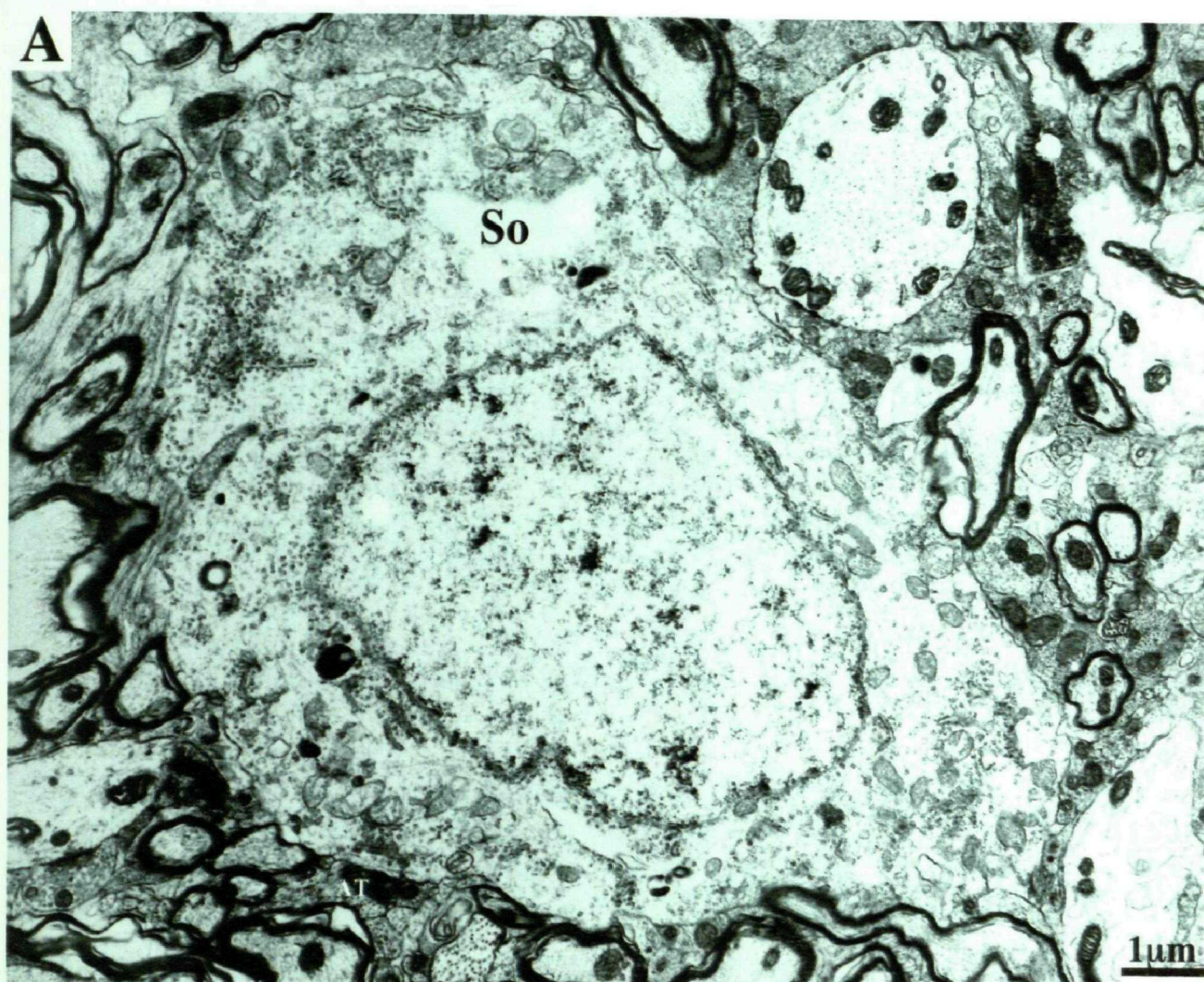
**iii. Características de la unión entre la terminal y la dendrita adyacente:** El tipo de sinapsis establecida, en los casos en que ésta pudo diferenciarse, fue de tipo asimétrico en un 27,7% de los casos y simétrica en un 11,1%. Las medias de los valores de aposición aparecen en la tabla 6. En ningún caso se apreciaron taxi bodies en este tipo de terminales. Tampoco en ningún caso pudieron diferenciarse en la terminal uniones de tipo puncta adhaerentia, sin poder descartar que ello fuera debido al acúmulo de producto de reacción.

**iv. Características postsinápticas:** Aunque en el 38,8% de los casos no aparecían orgánulos postsinápticos, el tipo más frecuentemente encontrado fue una cisterna de retículo endoplasmático (Fig. 23A). En las ocasiones en que aparecían dos orgánulos adyacentes (22,2%) uno de ellos fue siempre retículo endoplasmático. Mitocondrias próximas aparecieron en un 11,1% de estas terminales marcadas.

Sólo en una ocasión (cuya reinclusión se efectuó del caso G1191, desde un nivel central de vRPO e ipsilateral al lugar de inyección) se encontró una terminal marcada localizada simultáneamente sobre un soma neuronal ( $11,5\mu\text{m} \times 6,5\mu\text{m}$ ) y una dendrita proximal (Fig. 24). La terminal tenía una mayoría de vesículas sinápticas redondeadas y se encontraba en uno de los vértices de la unión entre los dos perfiles. Aunque el soma y la dendrita estaban en aposición directa ( $1,80\mu\text{m}$  de longitud), en ninguno de los tres niveles estudiados, se observó contacto sináptico ni unión GAP entre ellos. En el otro vértice de la aposición existía

**Figura 20.** Terminales marcadas con BDA (AT) en aposición sobre diferentes neuronas de vRPO (So).

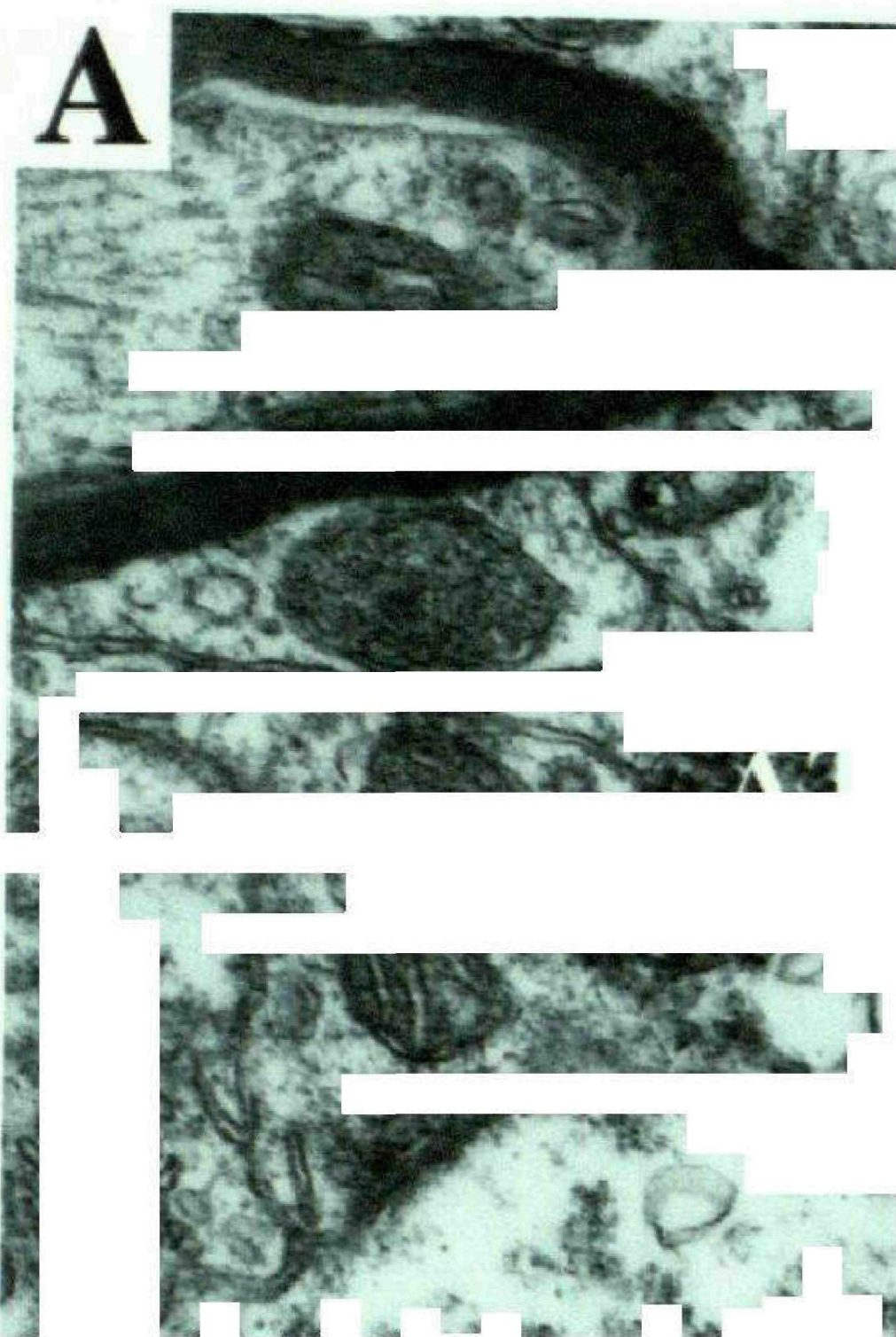




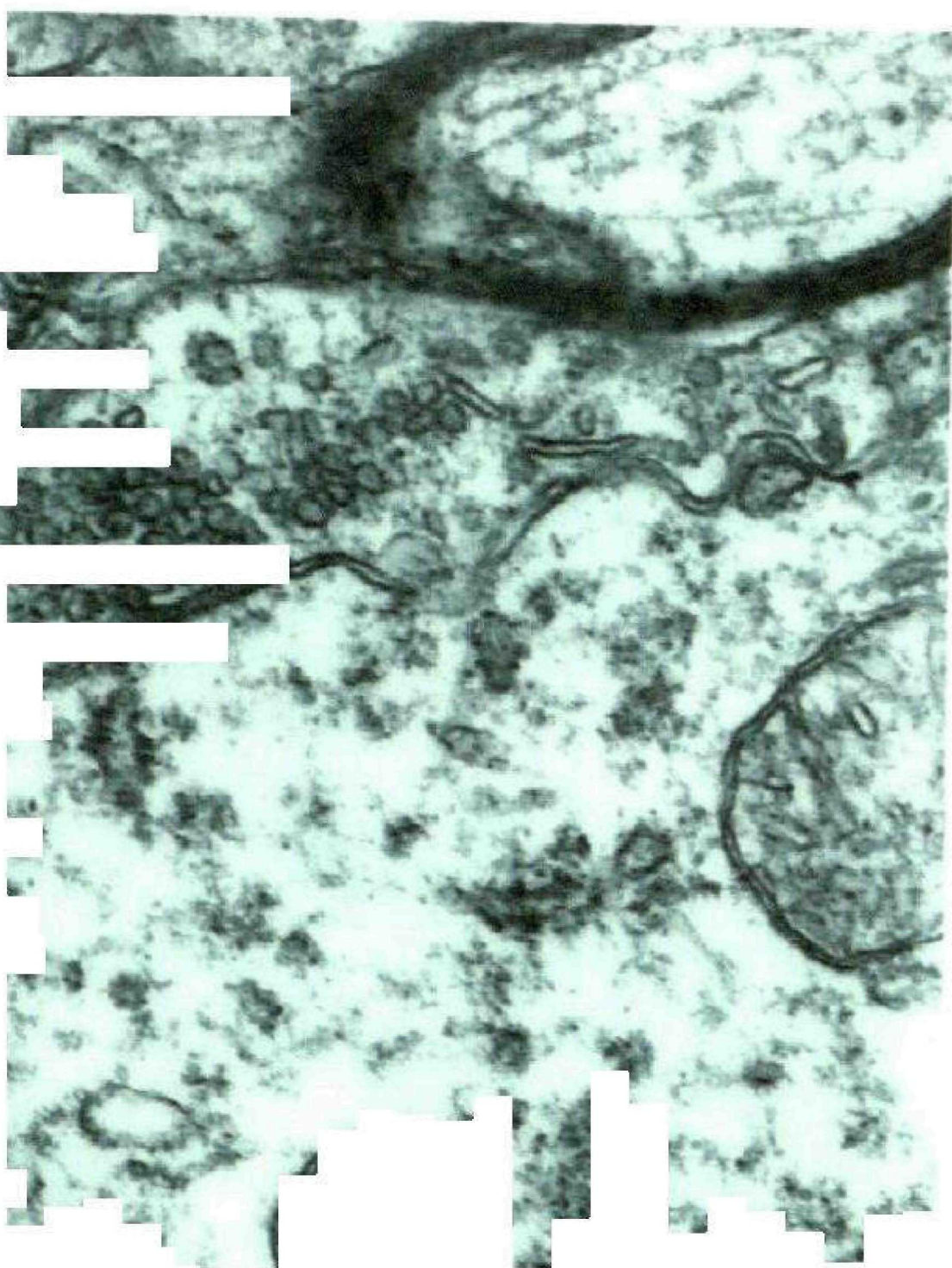
**Figura 21.** Terminal marcada con BDA (AT) adyacente a neurona de vRPO (So). La figura **A** representa el detalle en mayor aumento del recuadro dibujado en la panorámica **B**.

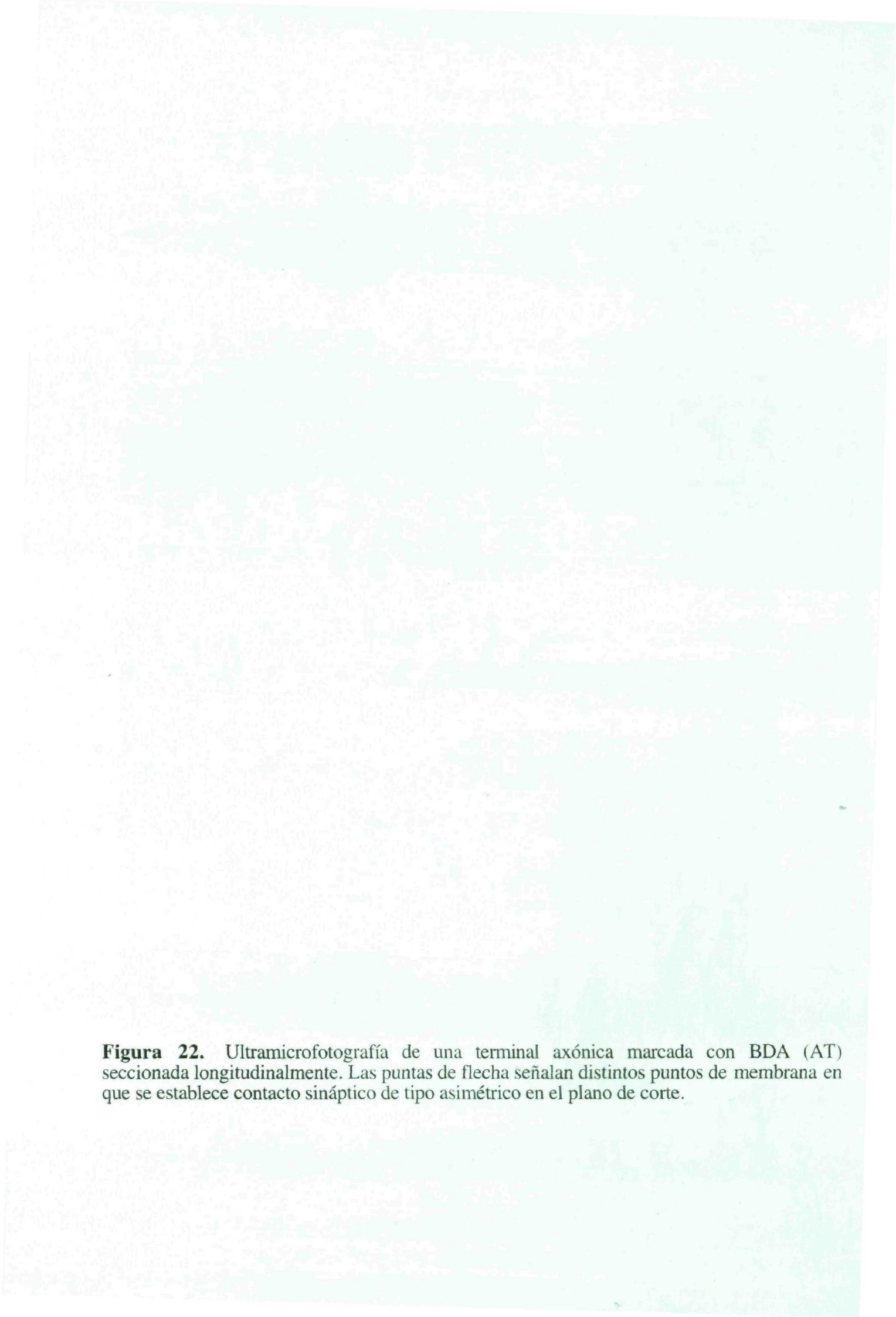


**A**



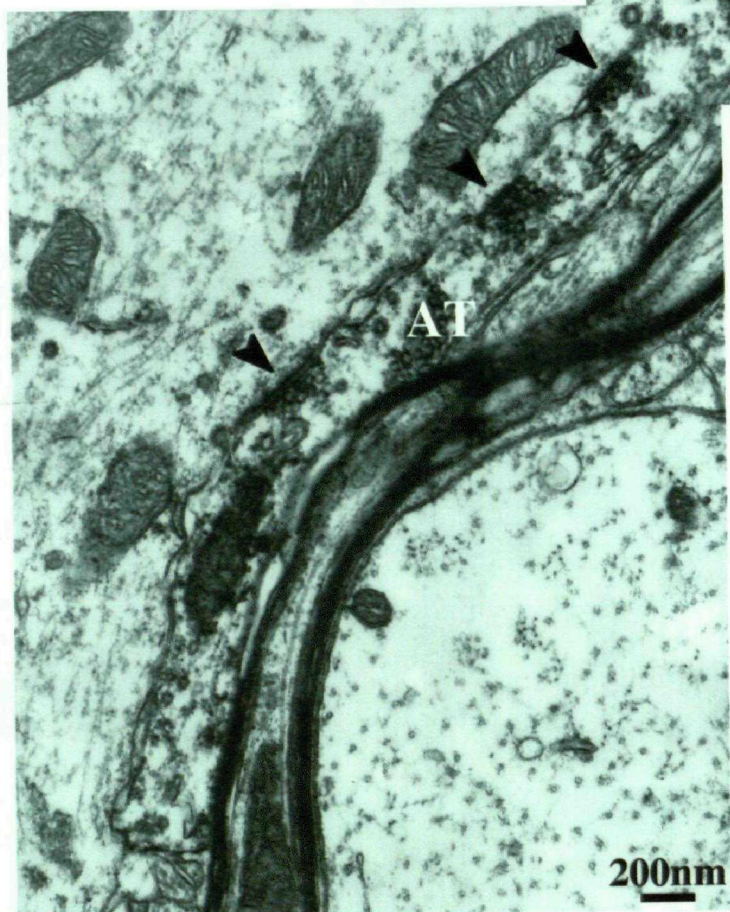
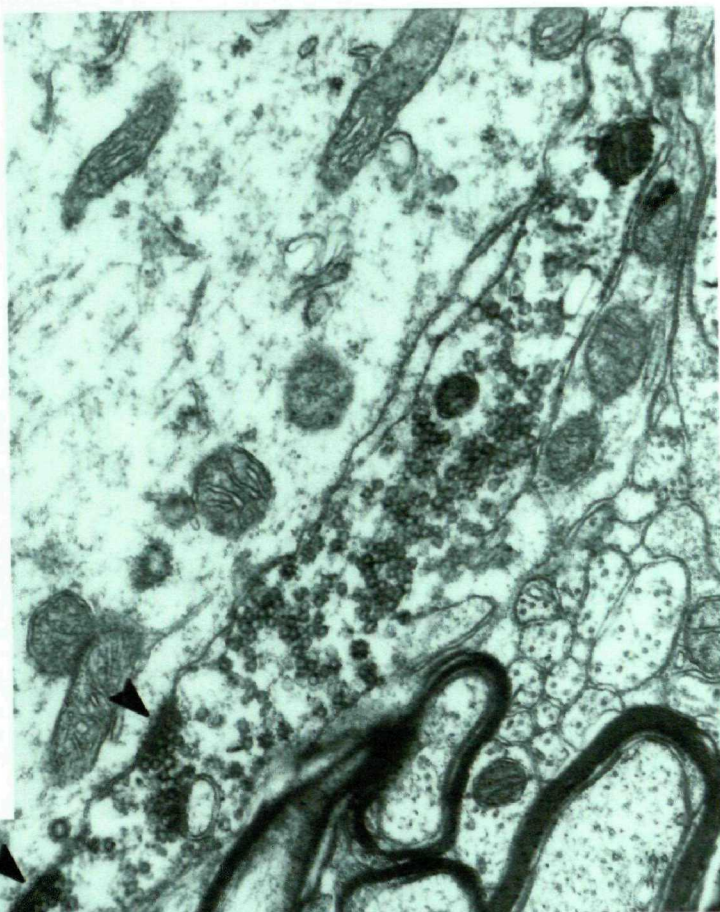




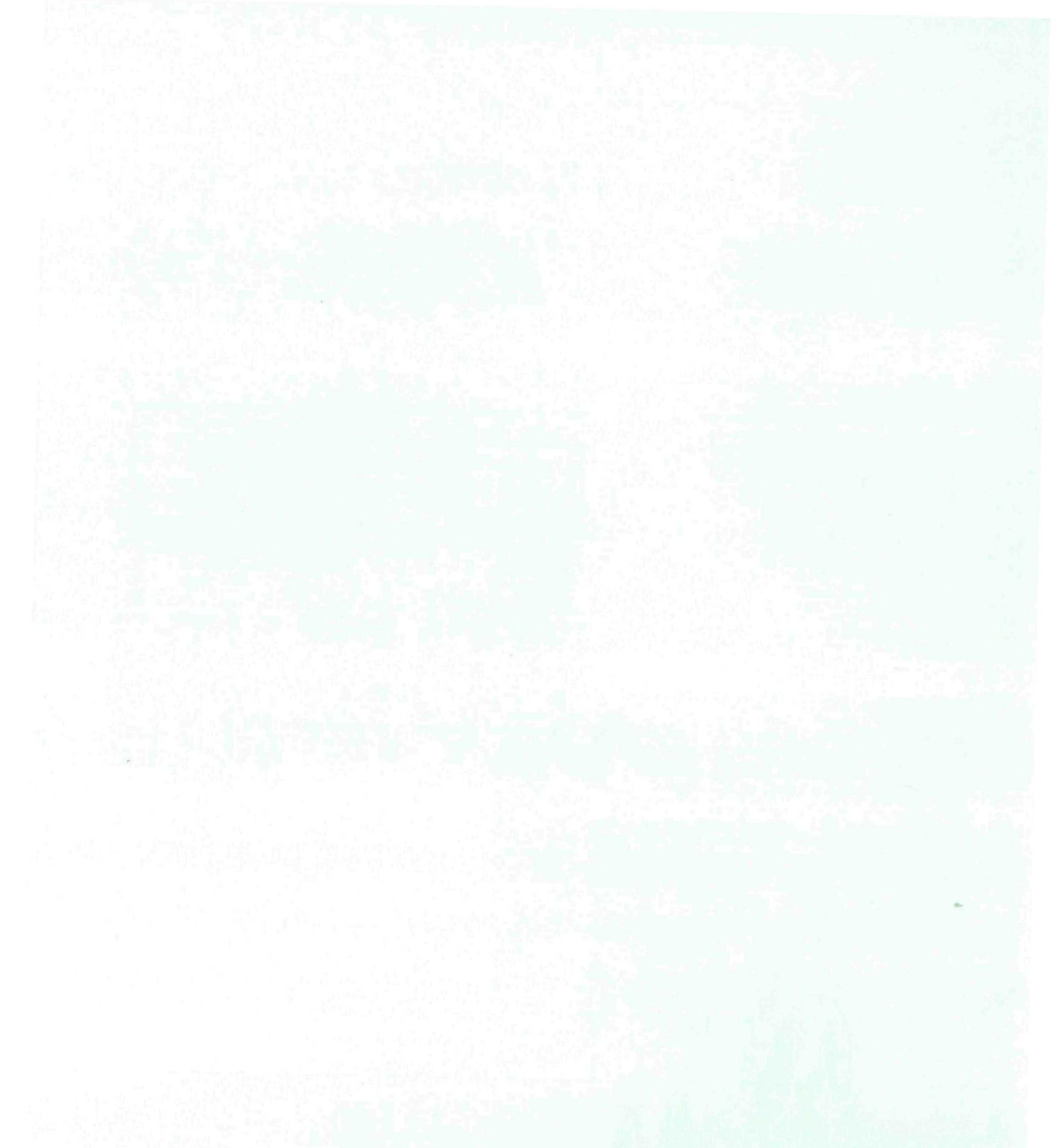
The image is a high-magnification electron micrograph showing a longitudinal section of an axonal terminal. The axon is filled with various organelles, including mitochondria and vesicles. The axonal membrane is clearly visible. Several arrowheads point to specific locations on the membrane where synaptic contact is established. The overall appearance is that of a detailed biological specimen.

**Figura 22.** Ultramicrofotografía de una terminal axónica marcada con BDA (AT) seccionada longitudinalmente. Las puntas de flecha señalan distintos puntos de membrana en que se establece contacto sináptico de tipo asimétrico en el plano de corte.



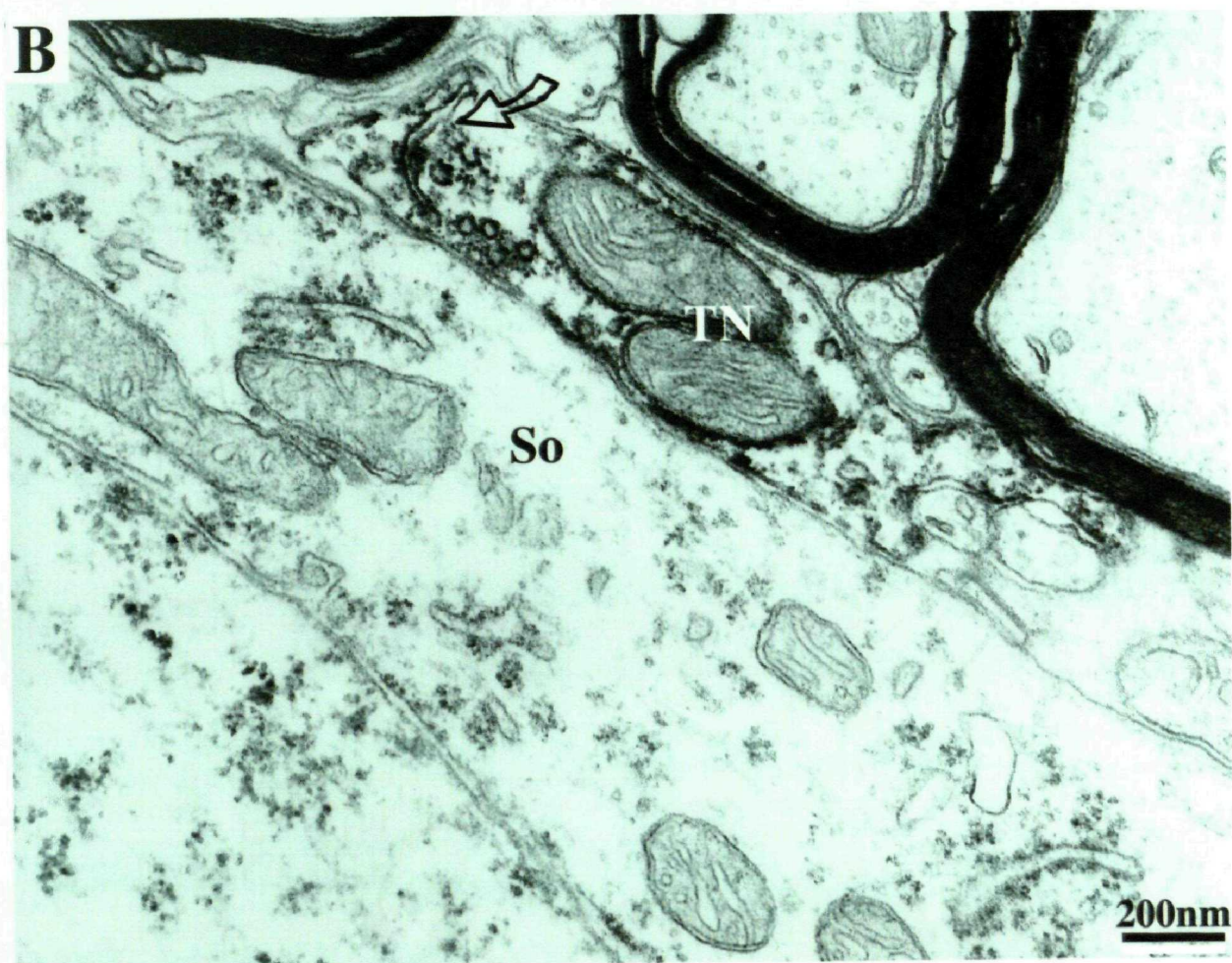
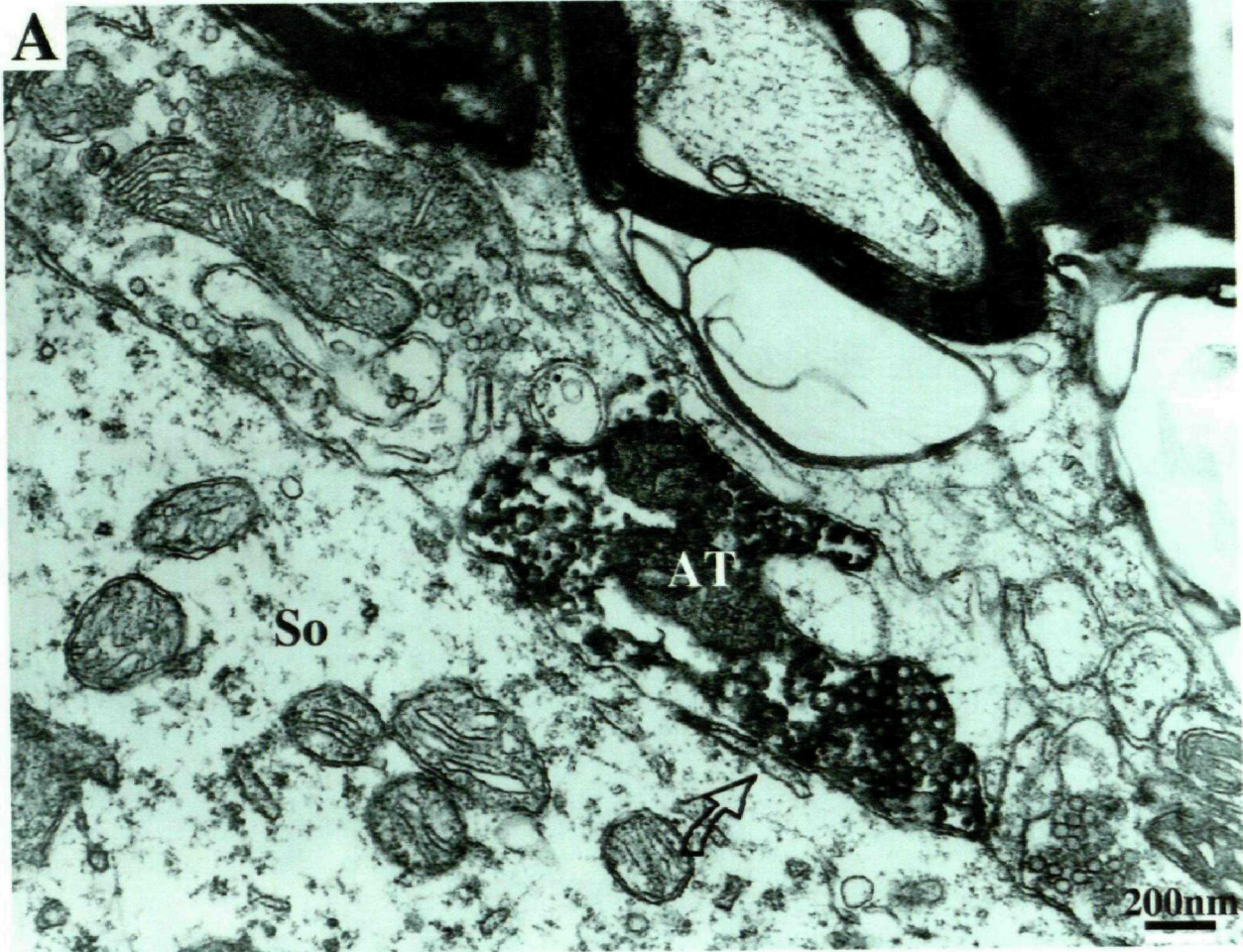




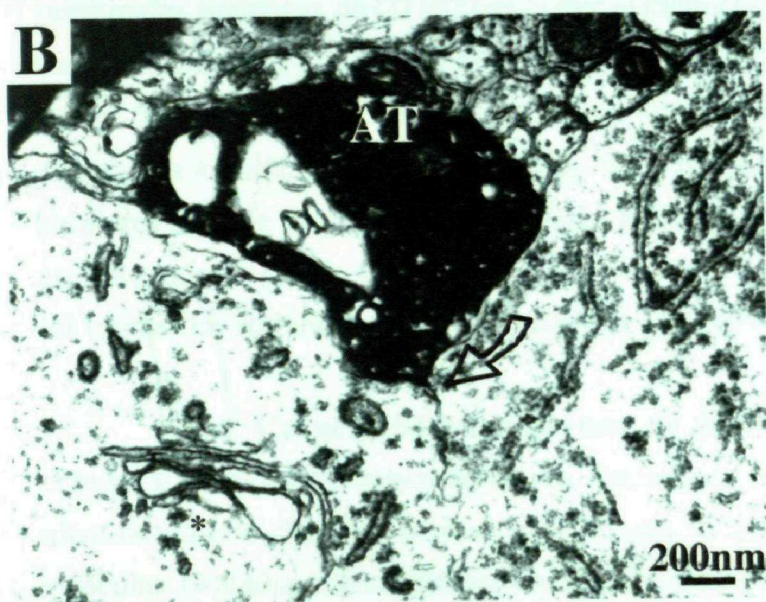
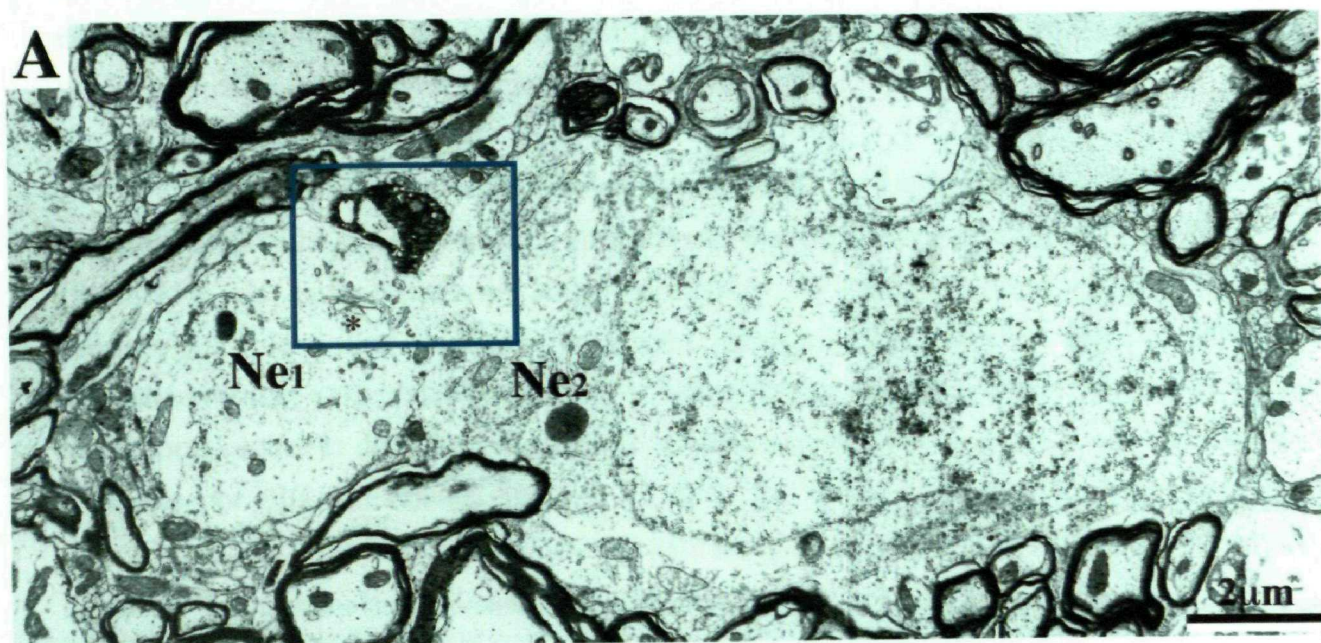


**Figura 23.** Botones terminales con trazador BDA adyacentes a dos distintas neuronas del vRPO (So). En la figura **A** obsérvese retículo endoplasmático (señalado con una flecha transparente) adyacente a la terminal (AT) a modo de cisterna subsináptica. En el citoplasma de la terminal nerviosa marcada (TN) que se aprecia en la figura **B** se observa una cisterna de retículo endoplasmático rugoso (señalado con flecha transparente) y escasas vesículas sinápticas agrupadas junto a la membrana.











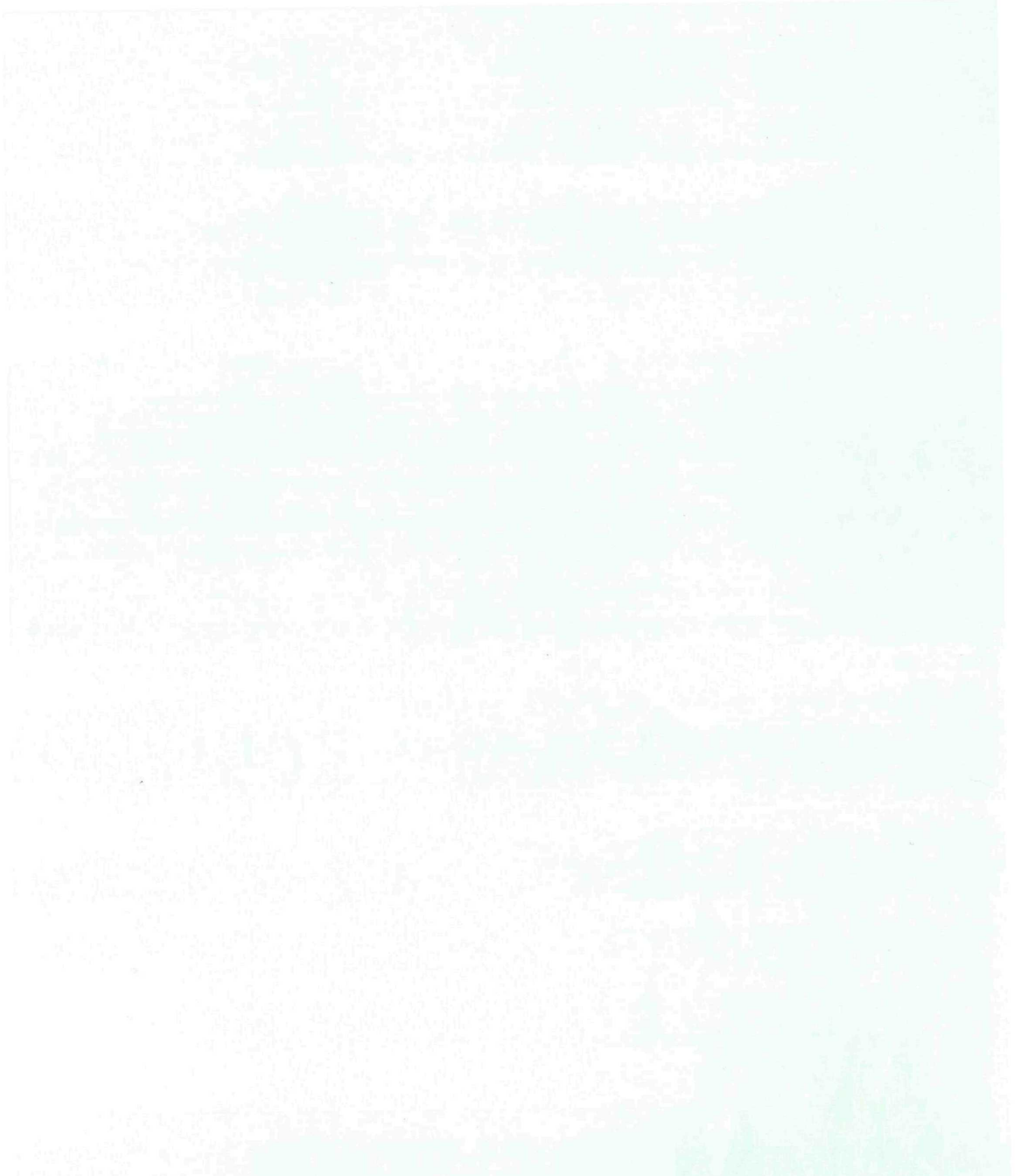
otra terminal no marcada, también con vesículas redondeadas que formaba un contacto asimétrico sobre el soma neuronal.

## 2.2. Terminales marcadas localizadas sobre las dendritas del neuropilo:

Se estudiaron un total de 192 terminales marcadas sobre las dendritas del neuropilo. 46 de las cuales establecían contacto sináptico en el plano de corte. En ninguno de los parámetros estudiados se encontraron diferencias significativas entre las terminales de G1191 y G1197, por lo que pasan a describirse conjuntamente a continuación.

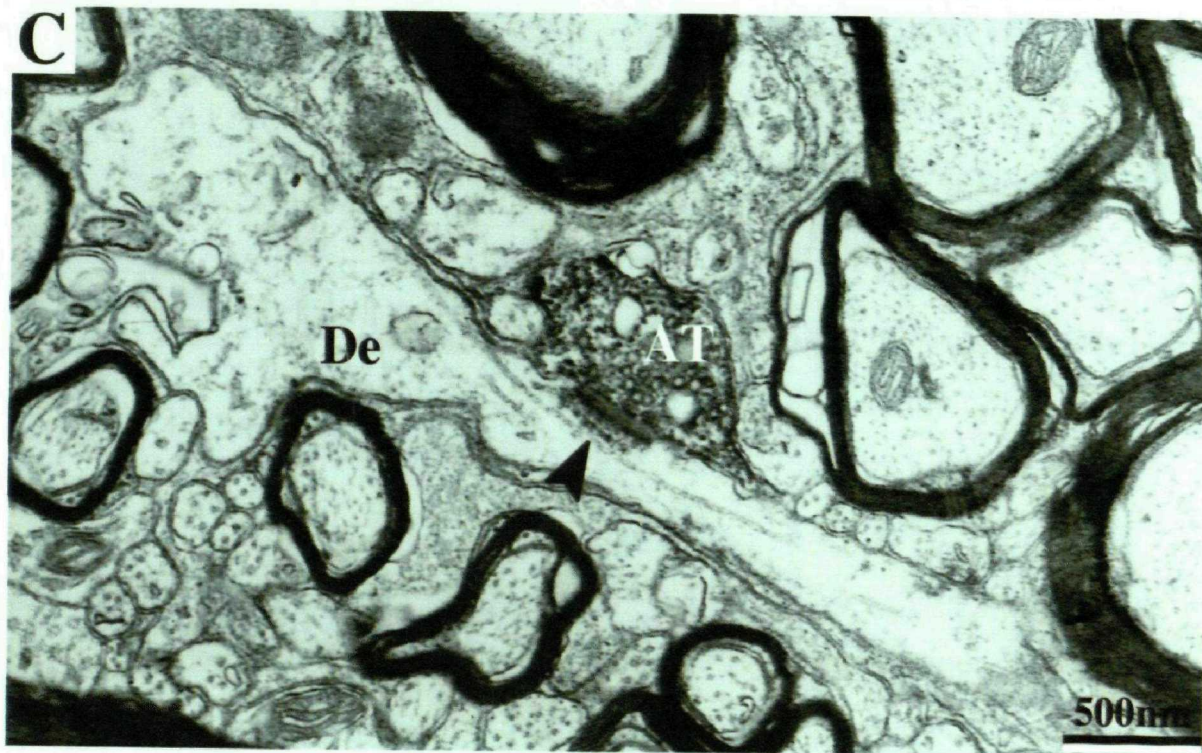
**i. Aspecto general de las terminales:** 1. La forma de la mayoría de las terminales marcadas era abovedada o alargada (se muestran varios ejemplos en la figura 25). El 48,95% de estas terminales tenían terminales no marcadas adyacentes, de diversa morfología, que solían contactar la misma dendrita (Fig. 26A). Algunas terminales adyacentes tenían vesículas pleomórficas y solían formar sinapsis simétricas (posiblemente inhibitoras) sobre la dendrita postsináptica a ambas terminales. El porcentaje de terminales rodeadas por glía y/o mielina fue del 42,70%. Su unión con la dendrita postsináptica generalmente era ondulada, aumentando de este modo la longitud de aposición. 2. El tamaño medio de las terminales analizadas fue menor de  $1\mu m^2$  (Tabla 6), exceptuando un caso (terminales sinápticas de G1197) en el que la media era superior; ello se debe a la variedad de tamaño observada y al escaso número de terminales estudiadas (8) en dicho caso. El valor medio del tamaño en el resto de las terminales localizadas sobre las dendritas, no mostró diferencias significativas entre animales. Por otra parte, los percentiles de sus valores son similares a los de las terminales de origen diverso localizadas sobre las neuronas marcadas, exceptuando un par de valores muy altos (Fig. 27B). Esta gráfica indica que los tamaños de las terminales son muy variables y similares en ambos tipos de axones.

**ii. Características internas de la terminal:** 1. Vesículas: Frecuentemente, debido al precipitado originado en las terminales, la forma de sus vesículas no pudo ser identificada con claridad. En los casos en que ésta pudo ser apreciada, las terminales con vesículas ovaladas representaban un 16,6% frente a un 73,9% de aquellas con vesículas redondeadas. Las vesículas granuladas fueron ocasionalmente detectadas en ambos tipos de terminales. En sólo tres terminales, el tipo de vesículas encontradas eran mayoritariamente aplastadas y el porcentaje de área de la terminal ocupado por ellas fue moderado. 2. Mitocondrias: Sus valores, muy variables, fueron similares (excepto en algunos valores muy altos) a los de las terminales de origen diverso localizadas sobre las neuronas marcadas (Figs. 27C. D). No se observaron diferencias significativas entre animales. 3. Retículo endoplasmático: Algunas terminales con poco marcaje tenían cisternas de retículo

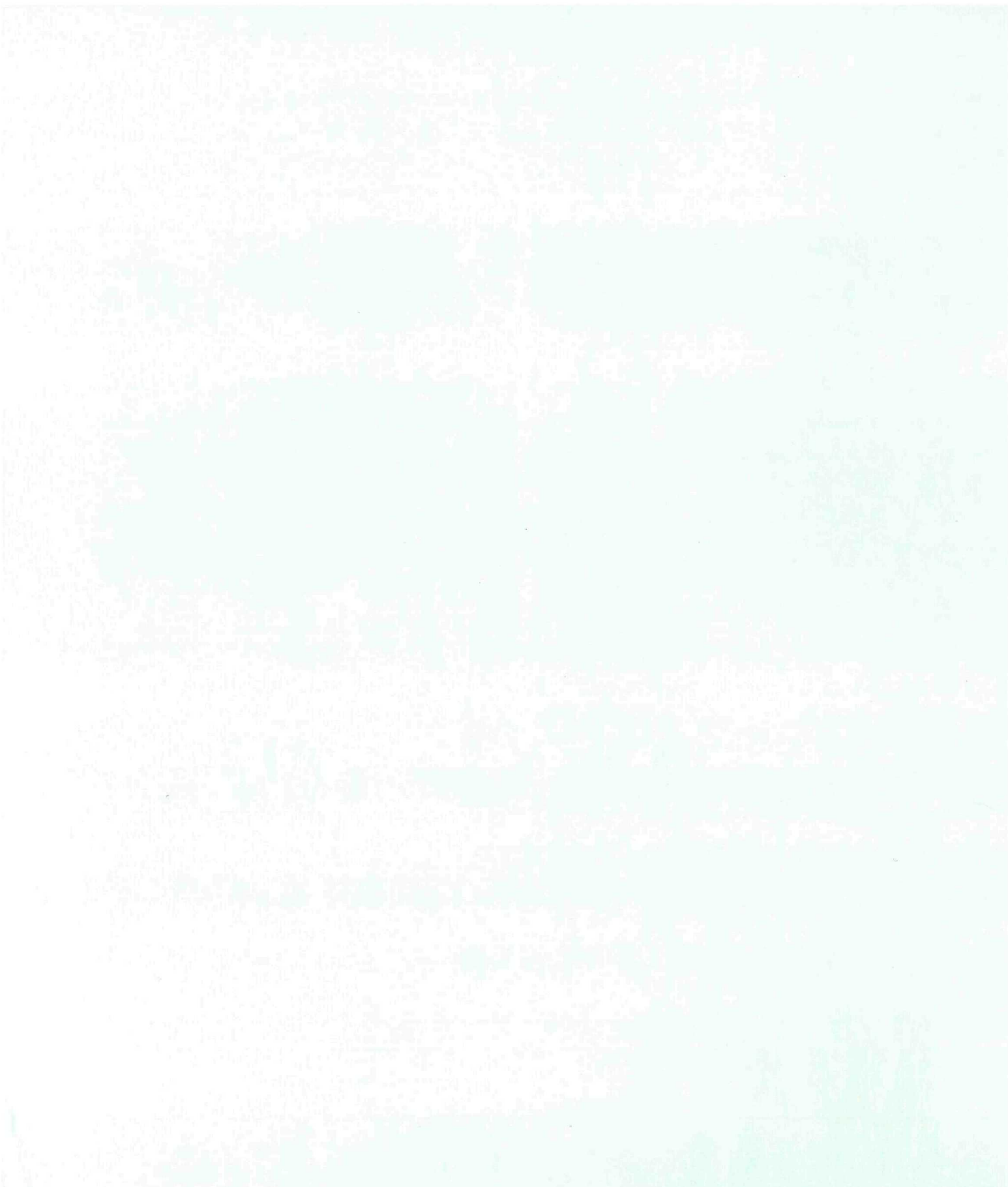


**Figura 25.** Microfotografías de microscopía electrónica mostrando diferentes tipos de terminales sinápticas marcadas (AT) localizadas sobre dendritas (De) del vRPO. Las puntas de flecha indican sinapsis de tipo asimétrico. Apréciense los taxi bodies de la figura C.



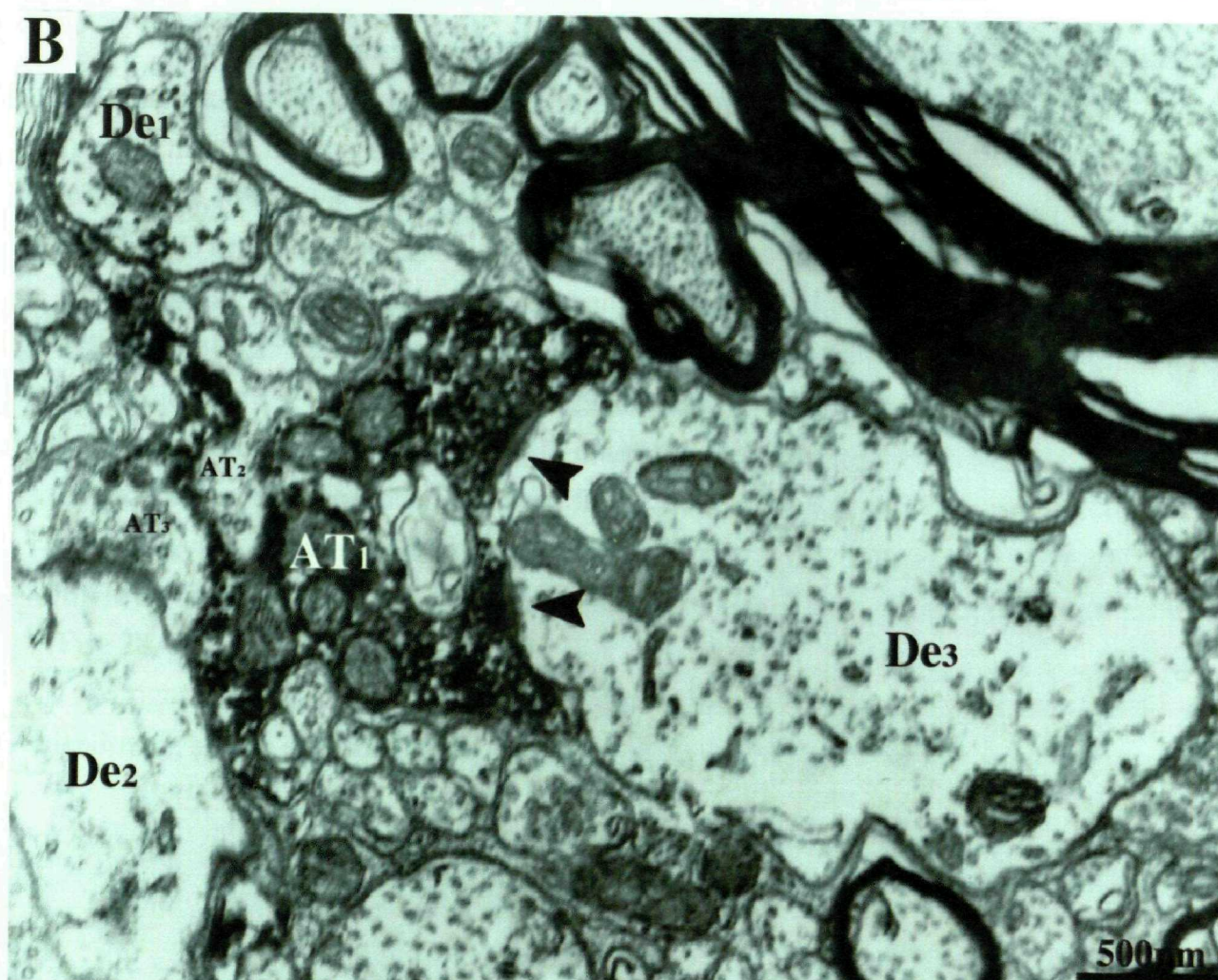
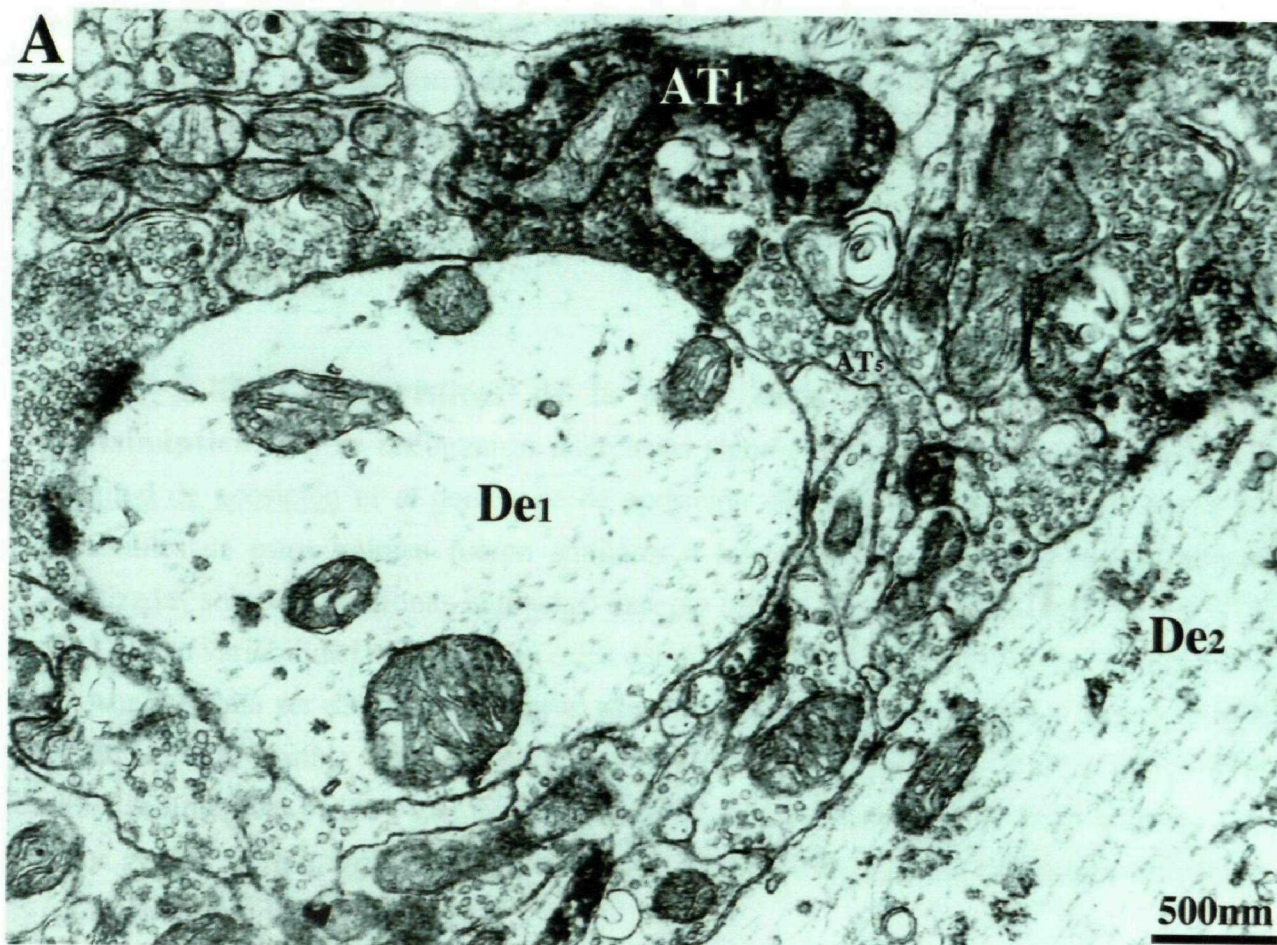




The image is a black and white micrograph showing a dense field of small, dark, punctate structures, which are BDA-labeled terminals, distributed throughout a lighter, textured background representing the neuropil. The terminals are concentrated in certain areas, particularly in the upper and middle sections of the frame. Some terminals appear to be in close proximity to each other, suggesting potential synaptic interactions. The overall appearance is that of a high-magnification electron micrograph or a very high-resolution light micrograph.

**Figura 26.** Imagen de terminales marcadas sobre dendrita en neuropilo (De) que establecen a su vez aposición sobre otras estructuras. En la figura **A** se ve cómo la terminal con BDA (AT1), que se encuentra adyacente a la dendrita De1, aparece invaginada por la terminal AT5, que también se encuentra adyacente a la dendrita2 (De2). La figura **B** muestra a la terminal marcada con BDA AT1 en aposición simultánea sobre las dendritas 1 y 2 y sobre las terminales AT2 y AT3, al mismo tiempo que efectúa contacto sináptico asimétrico (puntas de flecha) con la dendrita3.







endoplasmático en las que, debido al precipitado, era difícil identificar la presencia de ribosomas. Estas terminales se caracterizaban por su escaso número de vesículas que solían ser pleomórficas y estaban agrupadas junto a la zona de contacto que carecía de densidad postsináptica (Figs. 28A y 35A, E). 4. Otros: En sólo un caso se observó un cuerpo multivesicular, si bien en cuatro ocasiones se hallaron éstos en la dendrita sobre la que se establecía el contacto.

**iii. Características de la unión entre la terminal y la dendrita postsináptica:** No se encontraron diferencias significativas entre animales respecto a la longitud de aposición ni al porcentaje de aposición de las terminales. Por otra parte, los percentiles de estos valores fueron similares a los de las terminales de origen diverso localizadas sobre las neuronas marcadas, excepto un par de valores muy altos (Figs. 27E, F). La gran variabilidad observada en estos datos era parecida en los dos tipos de terminales.

Aunque solía ser difícil determinar el tipo de sinapsis establecida debido al precipitado, cuando ello fue posible se vio que el porcentaje de sinapsis asimétricas (20,3%) fue superior al de las simétricas (7,2%). La longitud de la zona activa no mostró diferencias respecto a los otros grupos de terminales estudiados. En el 7,5% del total de las terminales asimétricas aparecieron taxi bodies (Fig. 25C).

**iv. Estructura postsináptica:** La mayoría (48,43%) de las estructuras postsinápticas no tenía orgánulos próximos a la terminal. Sin embargo el 26,56% de las mismas mostró una mitocondria y el resto mostró retículo endoplasmático (10,4%), vesículas (4,16%) o vacuolas (2,6%). En el 7,29% de los casos aparecían simultáneamente dos tipos de orgánulos próximos, de los cuales uno era siempre una mitocondria.

Aunque las terminales marcadas estaban distribuidas sobre dendritas de diámetro muy variable (de 0,25 a 6,47  $\mu\text{m}$ ), se localizaron preferentemente en dendritas de tamaño intermedio (entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ ). La figura 29 muestra los porcentajes relativos de terminales localizadas sobre dendritas de diferente diámetro. Algunas terminales estaban localizadas sobre dendritas que mostraban una gran frecuencia sináptica (Fig. 30A). A veces, una sola dendrita recibía dos terminales marcadas distantes entre sí en el mismo plano de corte (Fig. 30B). En algunas ocasiones, la terminal marcada rodeaba casi por completo a la dendrita (Fig. 28A).

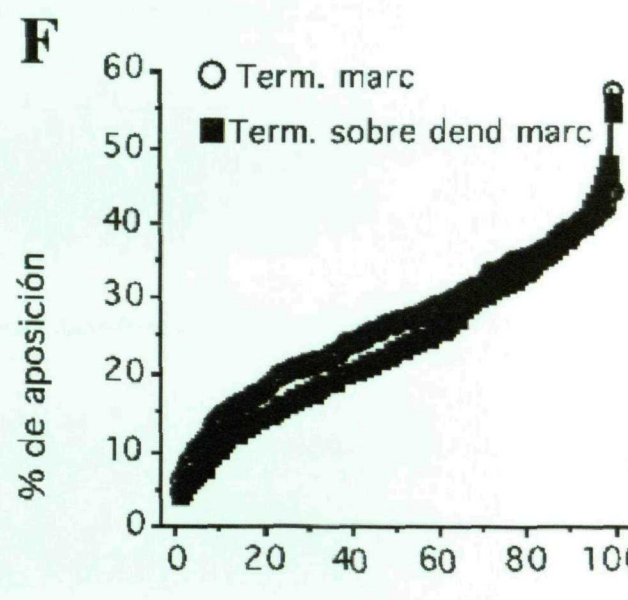
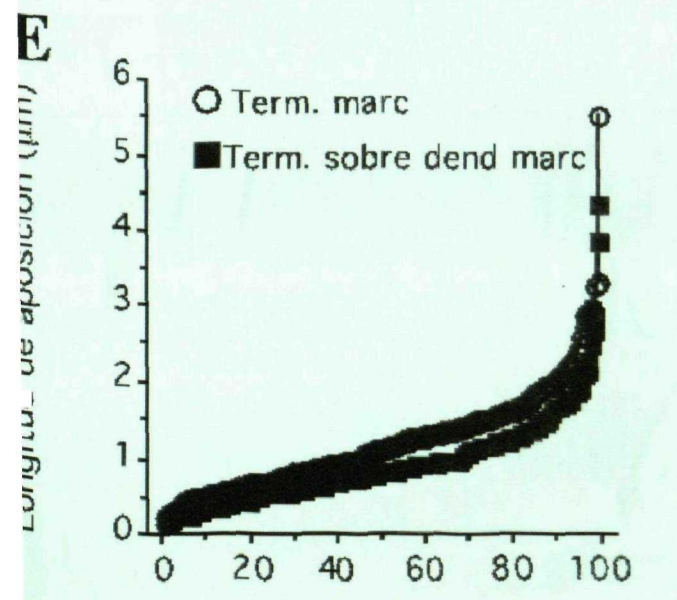
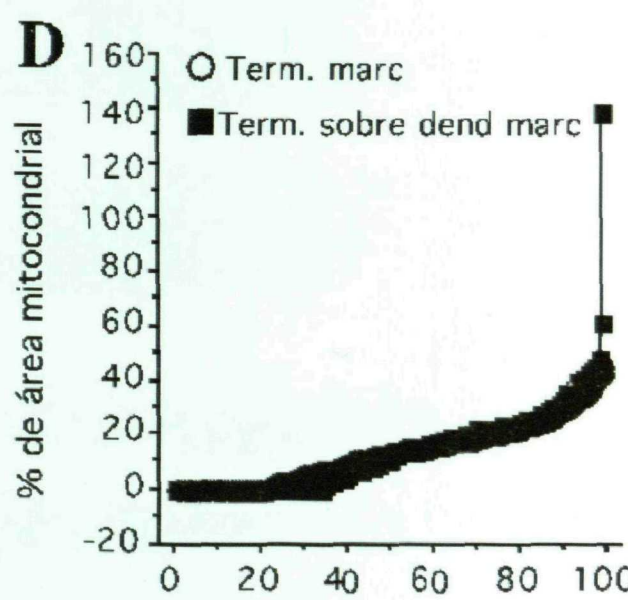
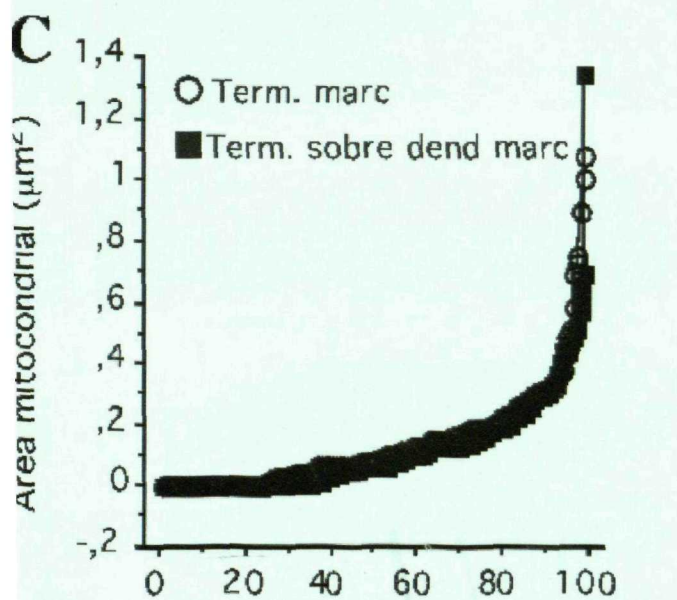
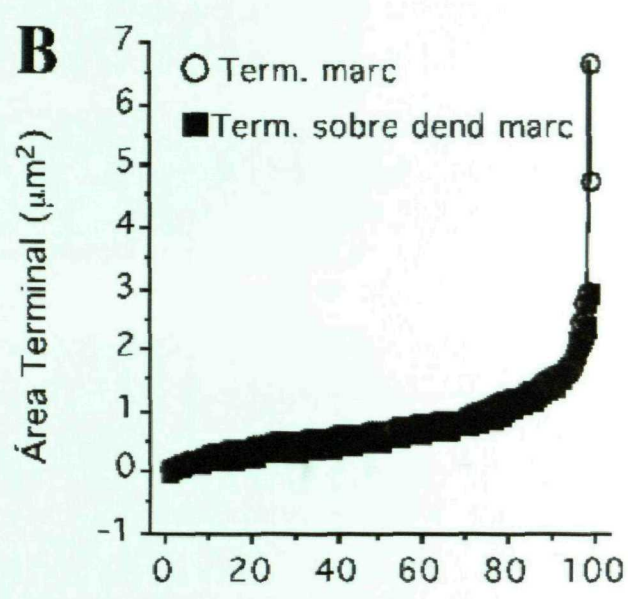
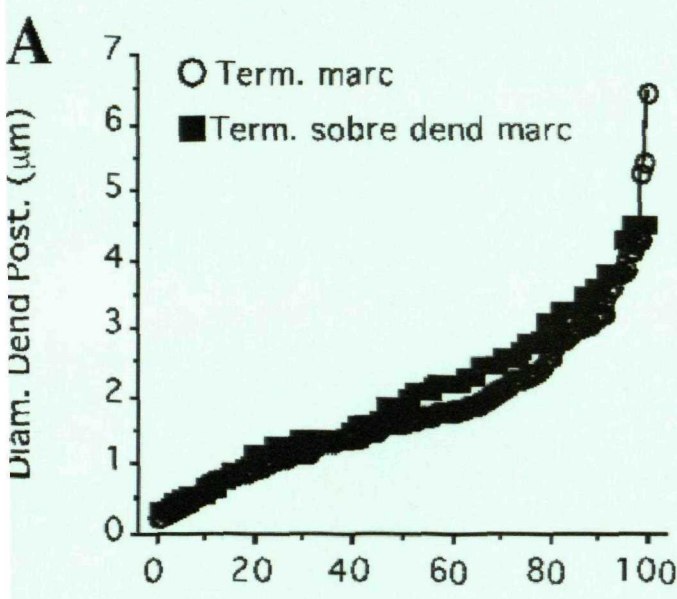
La figura 31B muestra una terminal adyacente a dos estructuras postsinápticas (ambas son dendritas), si bien sólo pudo observarse en un 3,12% de los casos.

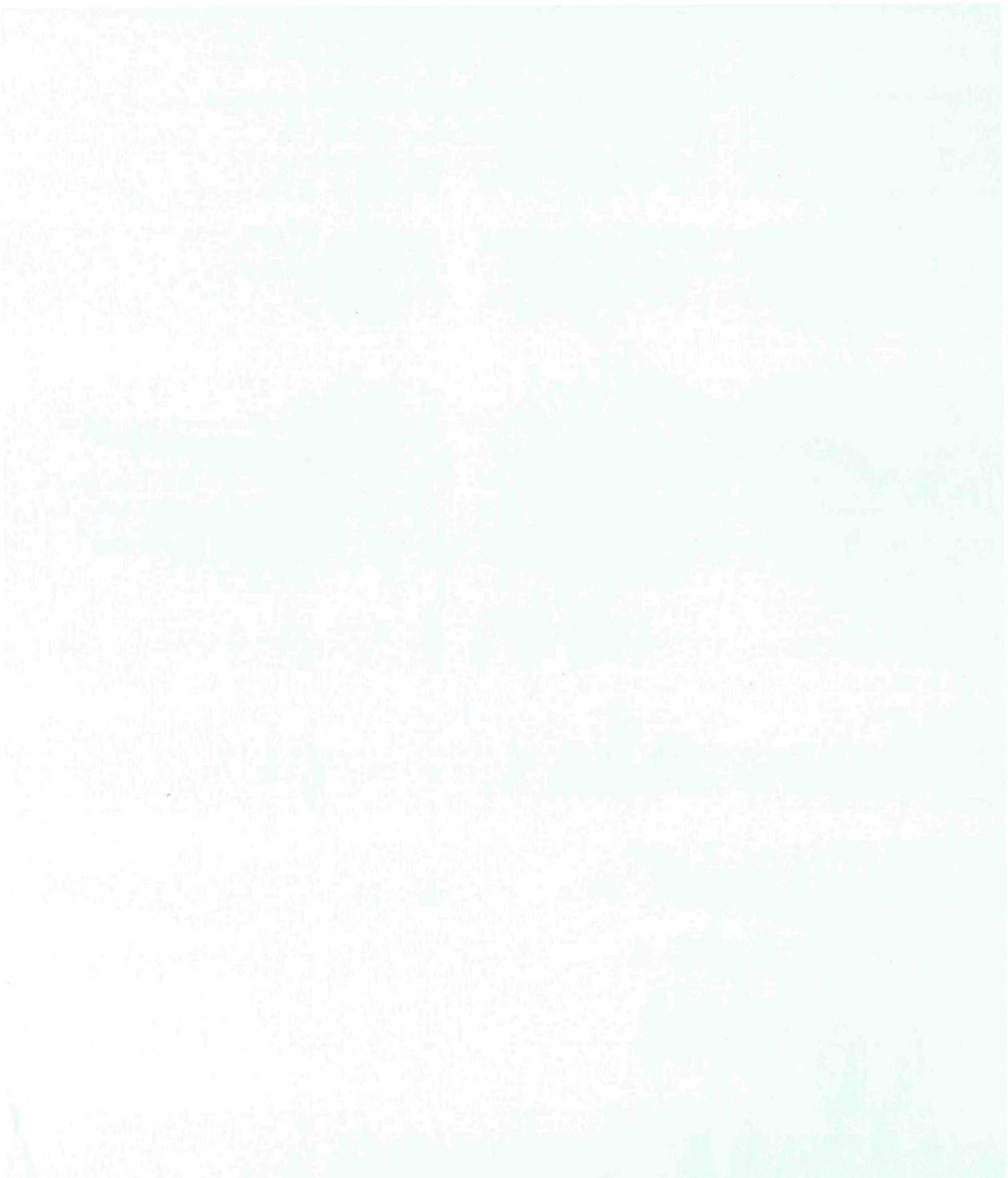


**Figura 27.** Percentiles de terminales marcadas y no marcadas sobre dendritas no marcadas o marcadas respectivamente. Se representa la población general total de terminales (adyacentes a o en contacto sináptico con las mismas). Apréciase la similitud de las curvas trazadas.

(Term: terminales; marc: marcadas; dend: dendrita; post: postsináptica; %: porcentaje)

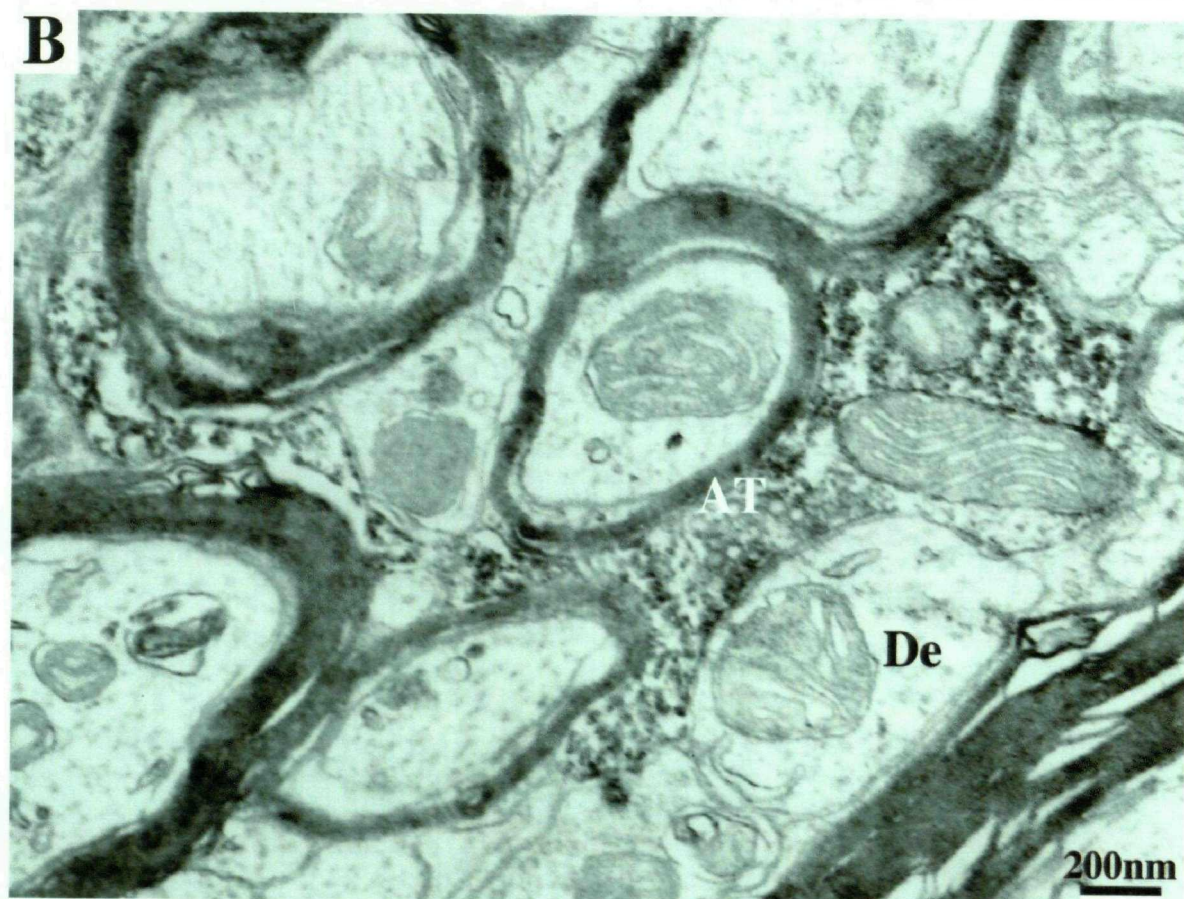
Percentiles de terminales marcadas y no marcadas sobre dendritas no marcadas o marcadas respectivamente. Población general de terminales.





**Figura 28.** Ultraestructura de terminales nerviosas marcadas (TN en **A** y AT en **B**) con una amplia longitud de aposición sobre la dendrita postsináptica (De). La terminal de la figura **A** muestra cisternas de retículo endoplásmico (flecha transparente), escaso número de vesículas sinápticas agrupadas junto a la membrana sináptica y sinapsis de tipo simétrico (flecha negra).

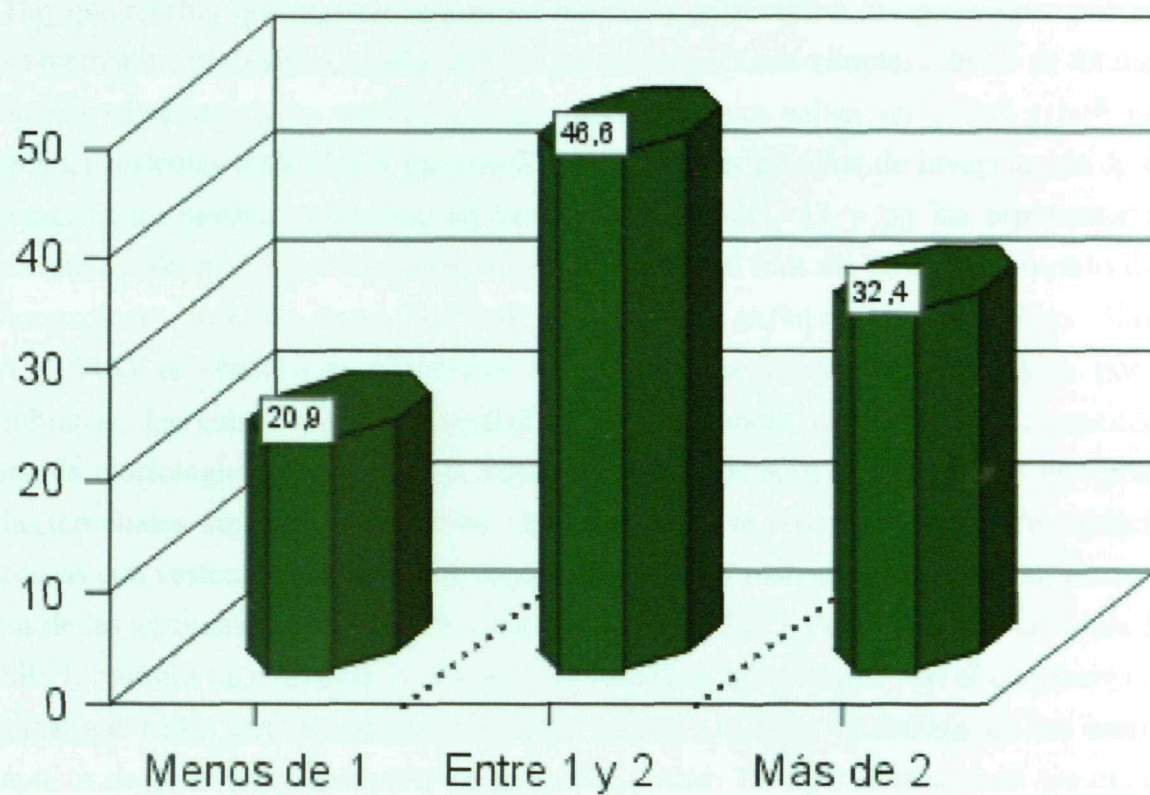
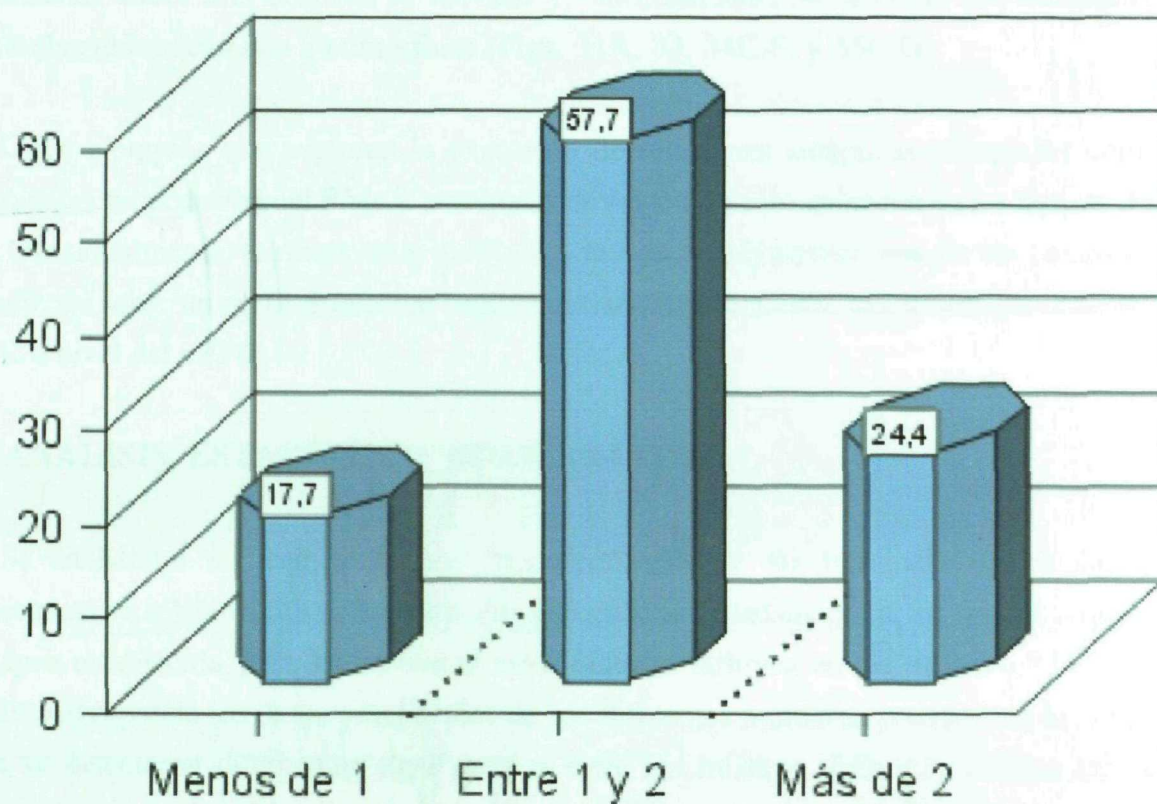






**Figura 29.** Gráficas representando los porcentajes de terminales marcadas que se encontraron sobre dendritas de diferente diámetro en neuropilo. La figura **A** muestra la población general de terminales, mientras que en la figura **B** se representan exclusivamente aquéllas en que se aprecia contacto sináptico en el plano de corte.

(Menos de 1, entre 1 y 2 y más de 2: dendrita de menos de  $1\mu\text{m}$ , de entre 1 y  $2\mu\text{m}$  y de más de  $2\mu\text{m}$  de diámetro, respectivamente; term: terminal; dend: dendrita)

**A****Terminales marcadas sobre dendrita en neuropilo****B****Term marcadas con sinapsis sobre dend en neuropilo**



### 2.3. Relaciones establecidas entre terminales marcadas y no marcadas

Hay que resaltar que algunas terminales marcadas presentaban invaginaciones profundas de su membrana plasmática, producidas por las prolongaciones citoplasmáticas de terminales sinápticas adyacentes y no marcadas. Estas prolongaciones solían ser cortas y bulbosas y contenían vesículas (redondas o pleomórficas). Diferentes estadios de invaginación de estas prolongaciones pueden observarse en las figuras 26, 32C, 33 y en las representaciones esquemáticas de las figuras 34, donde, a veces, la terminal rodeaba casi por completo dichas prolongaciones. Además, en un 7,81% de las terminales axónicas marcadas (Figs. 32A, B; 33A y 34A) se observaron estructuras no marcadas separadas del axoplasma por dos membranas, las cuales contenían vesículas claras redondas o pleomórficas; teniendo en cuenta la morfología de las vesículas, estas estructuras parecen originarse por invaginación de las terminales sinápticas adyacentes. Ocasionalmente se observó lo contrario: estructuras marcadas con vesículas, invaginadas en una terminal no marcada, que podrían formarse a partir de las terminales marcadas adyacentes (Figs. 33 y 34C). Por otra parte, la figura 33A, detalle 1, muestra una vesícula de endocitosis (mediada por receptor) en el citoplasma de la terminal que rodea una estructura invaginada, similar a las que se forman en los contactos sinápticos después de la liberación del neurotransmisor. De aquí se deduce la presencia de contactos sinápticos entre la terminal axónica y la estructura invaginada. Este tipo de vesículas también pudo observarse entre terminales adyacentes localizadas sobre dendrita (Fig. 33A, detalle 2). A veces, el número de interrelaciones entre las terminales adyacentes localizadas sobre una dendrita es elevado y, curiosamente, se alternan las terminales de vesículas redondeadas o pleomórficas (Figs. 31A, 33, 34C.F, y 35C.G).

Otros ejemplos que sugieren la existencia de relaciones sinápticas complejas entre las terminales procedentes del RMc y terminales de origen diverso aparecen en las figuras 35D y 36. Ocasionalmente, se observaron terminales marcadas adyacentes una de las cuales estaba localizada sobre un perfil dendrítico sugiriendo interacciones entre terminales procedentes del RMc a nivel del vRPO.

### 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO COMPARATIVO

Se analizaron las características ultraestructurales de las terminales (marcadas o no marcadas) en relación con su localización, su estructura postsináptica, su origen o el tipo de sinapsis establecida, para determinar si estos factores influyen en las mismas. El análisis se realizó agrupando los datos procedentes de los diferentes animales, excepto en los casos en que se detectaron diferencias significativas entre los mismos, esto es, únicamente, en el grupo de terminales ubicadas sobre soma y dendrita proximal de neurona marcada (Tabla 5;

**Figura 30.** Fotografías en el microscopio electrónico de terminales marcadas sobre dendrita en neuropilo (De). Obsérvese en **A** cómo la misma dendrita recibe un elevado número de otras terminales que no proceden del RMc (AT2 a AT8). La flecha transparente indica una estructura marcada probable invaginación de AT1. En la figura **B** en cambio se muestra una dendrita sobre la que se encuentran tres terminales procedentes de RMc (AT1 a AT3). Las puntas de flecha indican sinapsis de tipo asimétrico.



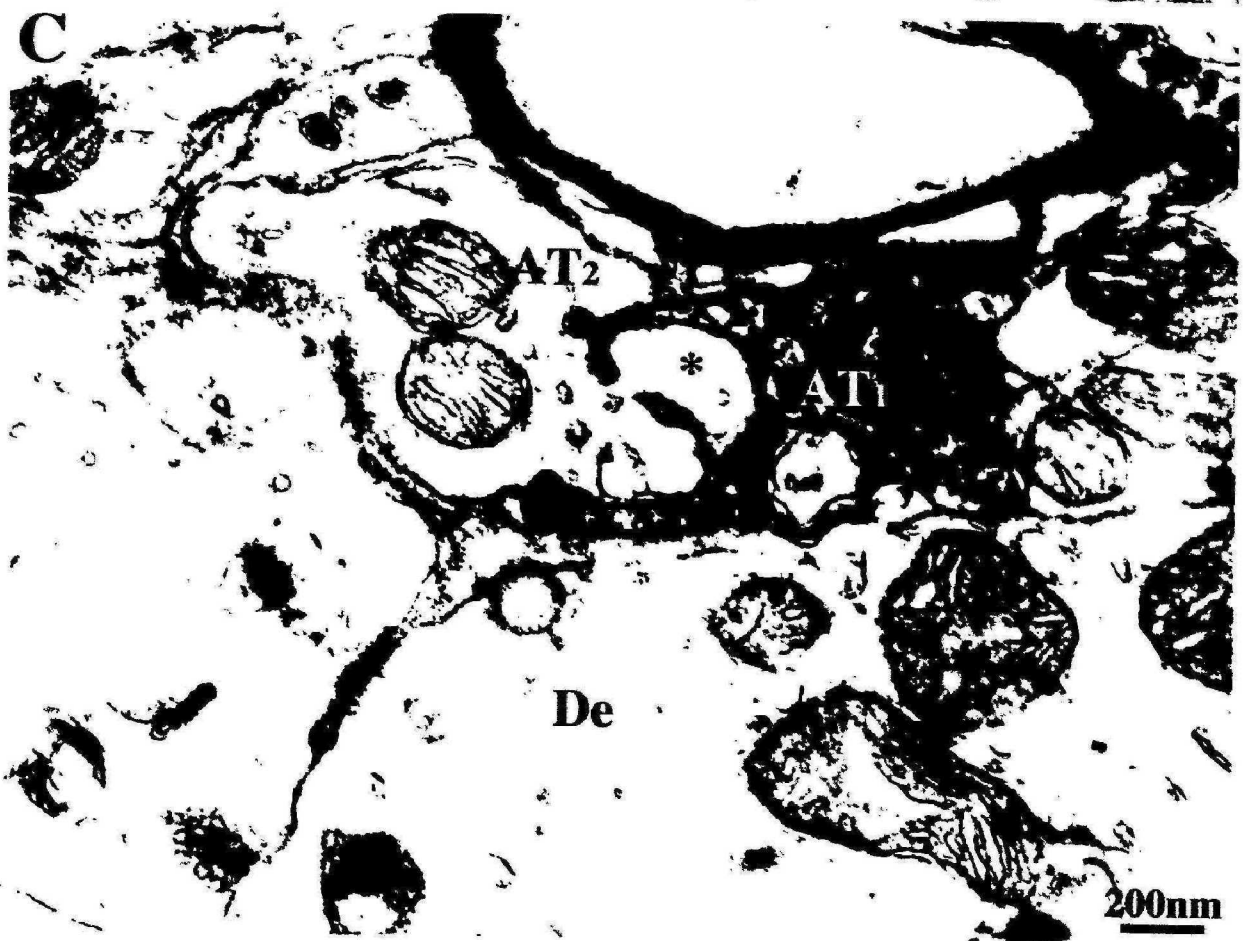


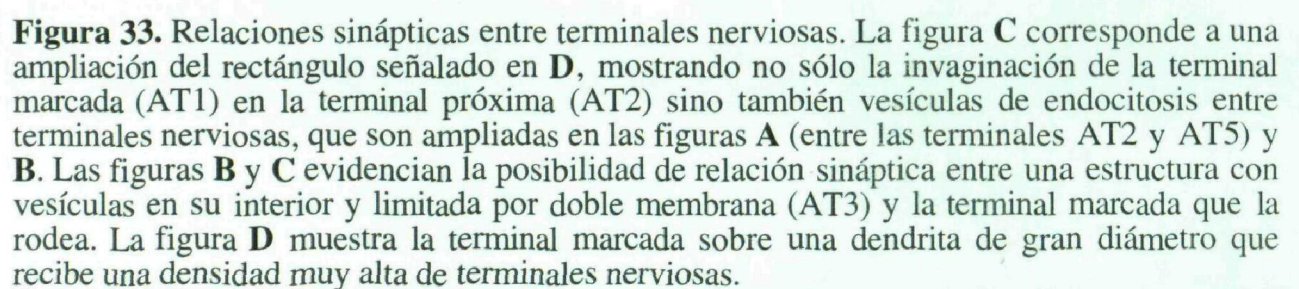
**Figura 31.** Terminales marcadas adyacentes a dendritas en neuropilo. **A:** Ejemplo de la relación compleja que puede establecerse entre diferentes terminales axónicas próximas. Obsérvese cómo la terminal asimétrica AT3 se invagina en AT2, con mayoría de vesículas ovaladas y aplastadas, que a su vez se imbrica sobre la terminal AT1, marcada con BDA, de vesículas redondeadas. **B:** Observamos en esta imagen una terminal marcada (AT) en aposición simultánea sobre dos estructuras postsinápticas no marcadas, en este caso dos dendritas (De1 y 2).



**Figura 32.** Ultramicrofotografías de terminales axónicas marcadas en cuyo axoplasma se observan unas estructuras aisladas por doble membrana (señaladas con asteriscos), que contienen vesículas sinápticas, y que probablemente representan invaginaciones de las terminales no marcadas adyacentes (AT2), como se puede deducir fácilmente observando la figura C.

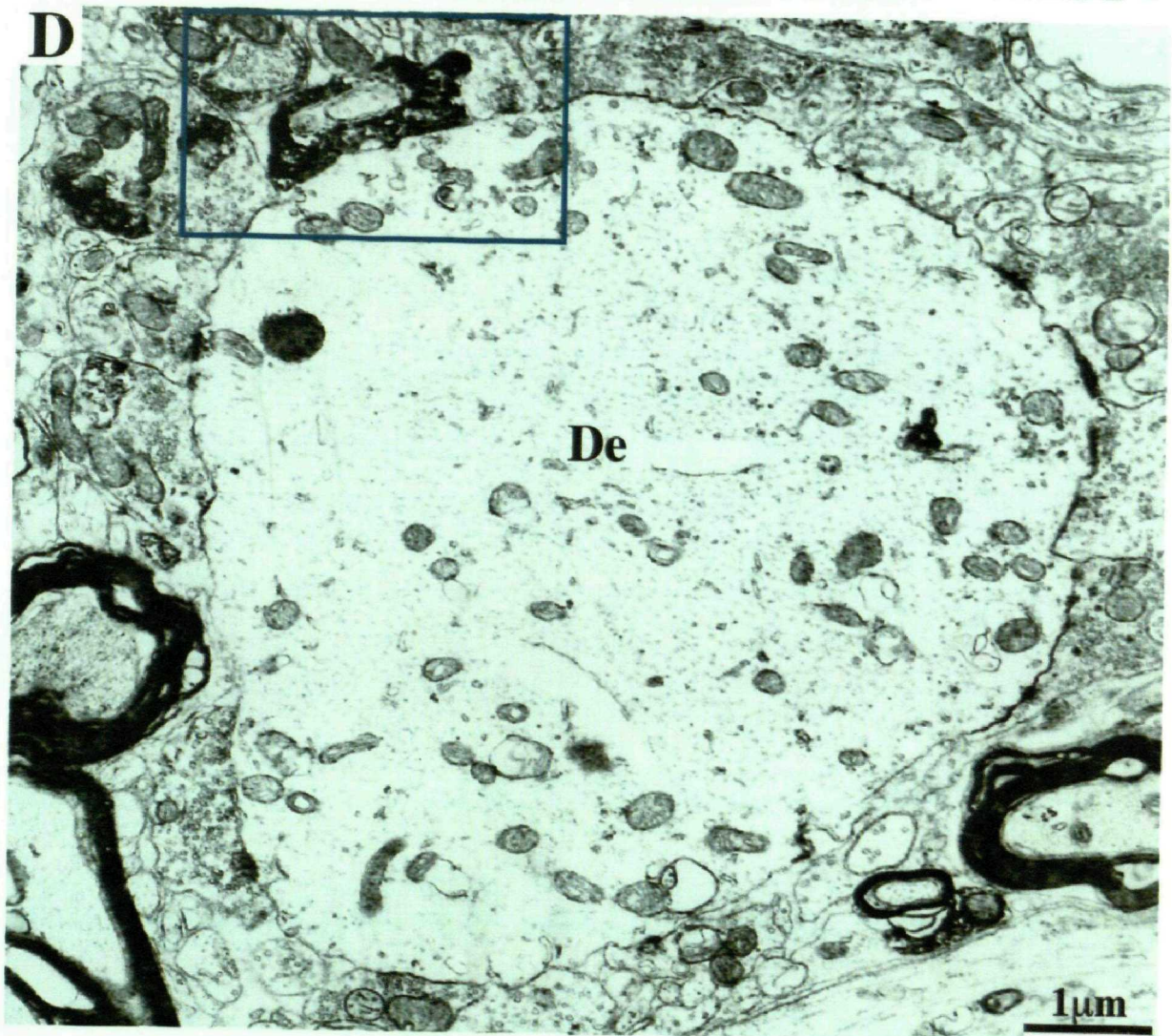
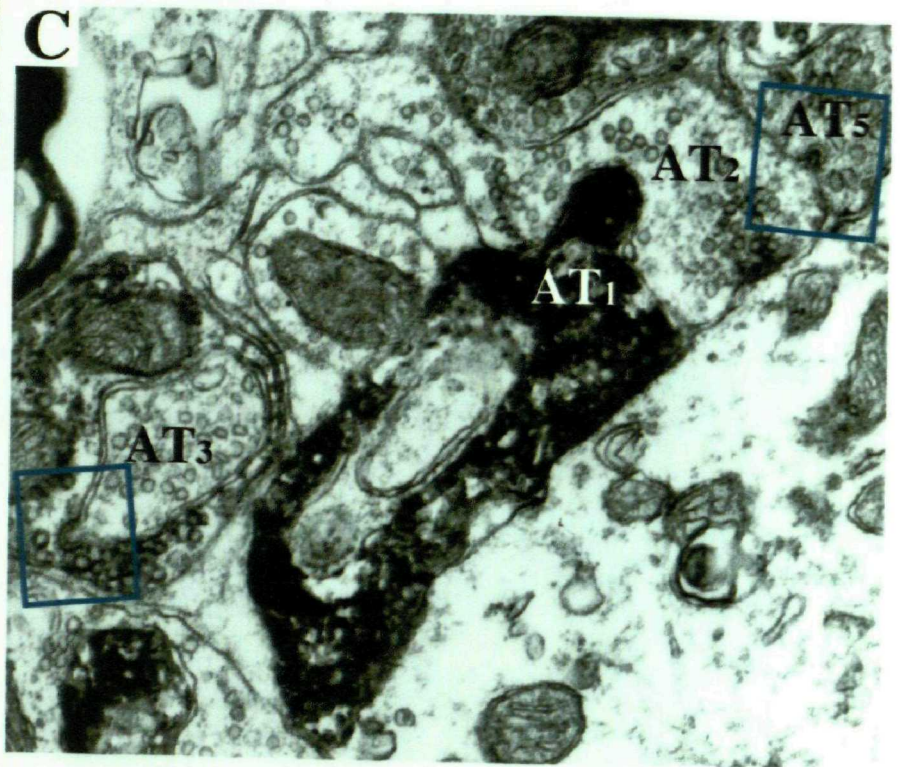
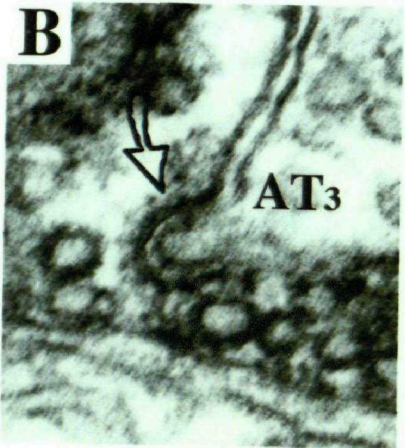
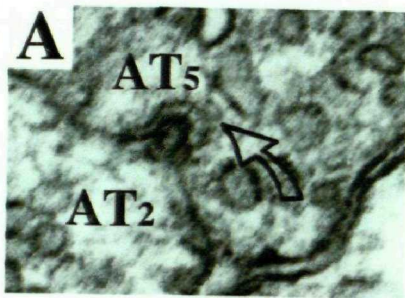






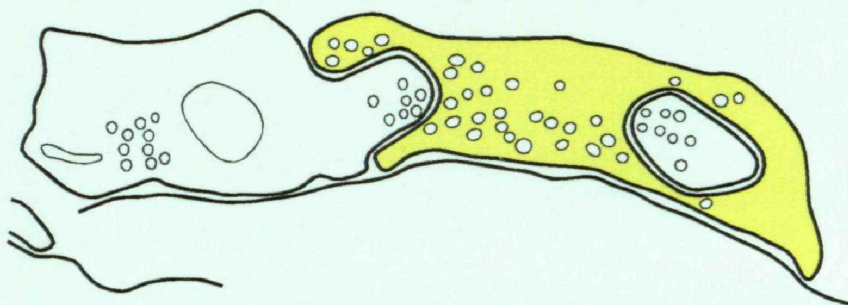
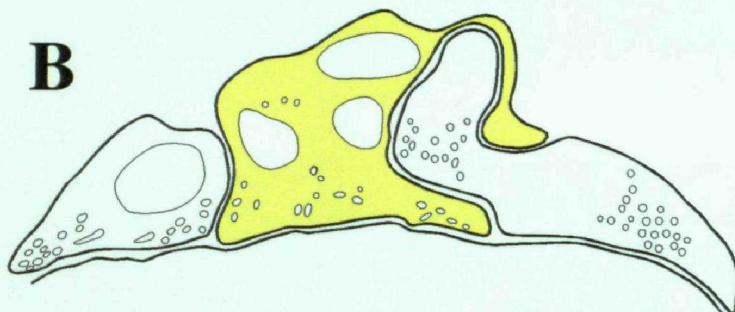
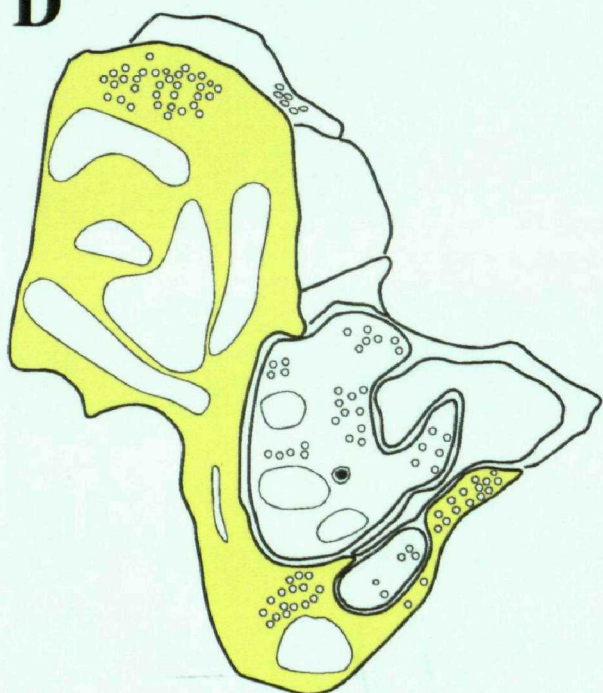
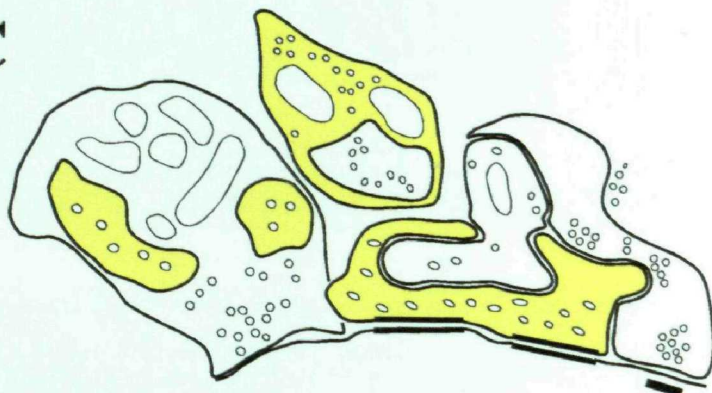
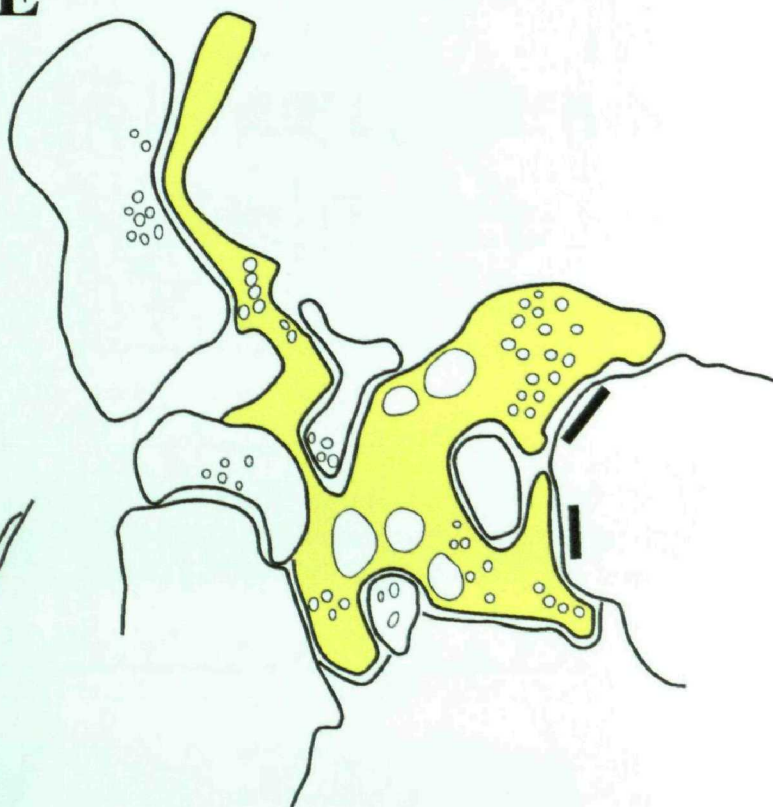
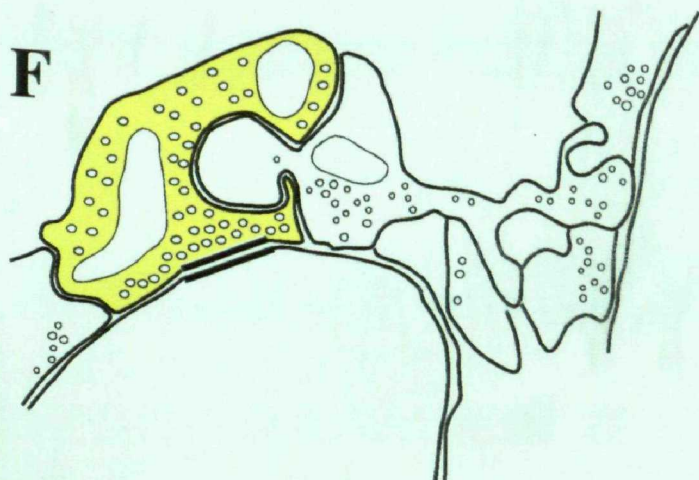
**Figura 33.** Relaciones sinápticas entre terminales nerviosas. La figura **C** corresponde a una ampliación del rectángulo señalado en **D**, mostrando no sólo la invaginación de la terminal marcada (AT1) en la terminal próxima (AT2) sino también vesículas de endocitosis entre terminales nerviosas, que son ampliadas en las figuras **A** (entre las terminales AT2 y AT5) y **B**. Las figuras **B** y **C** evidencian la posibilidad de relación sináptica entre una estructura con vesículas en su interior y limitada por doble membrana (AT3) y la terminal marcada que la rodea. La figura **D** muestra la terminal marcada sobre una dendrita de gran diámetro que recibe una densidad muy alta de terminales nerviosas.







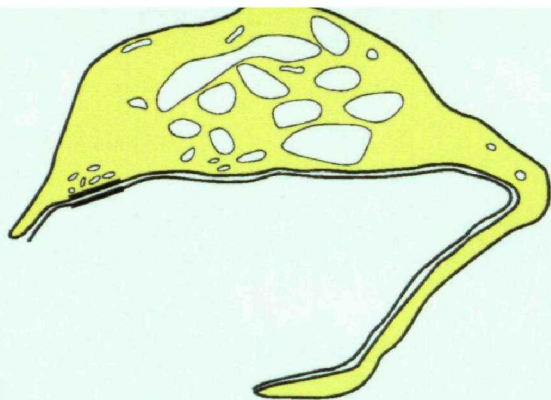
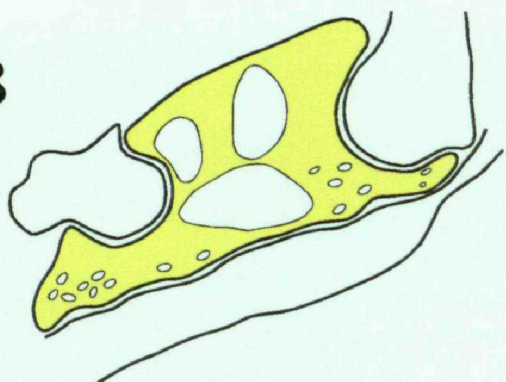
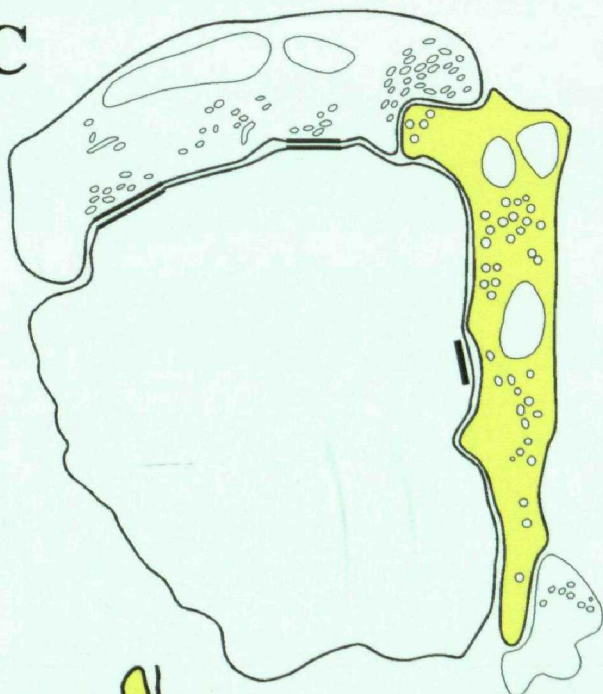
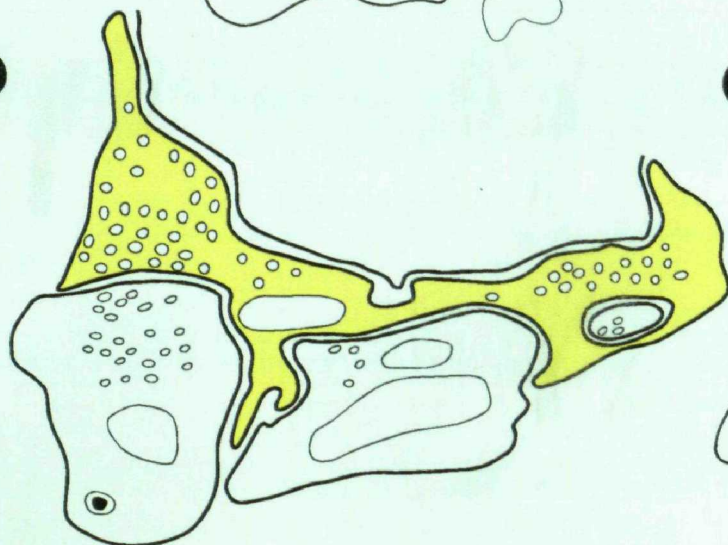
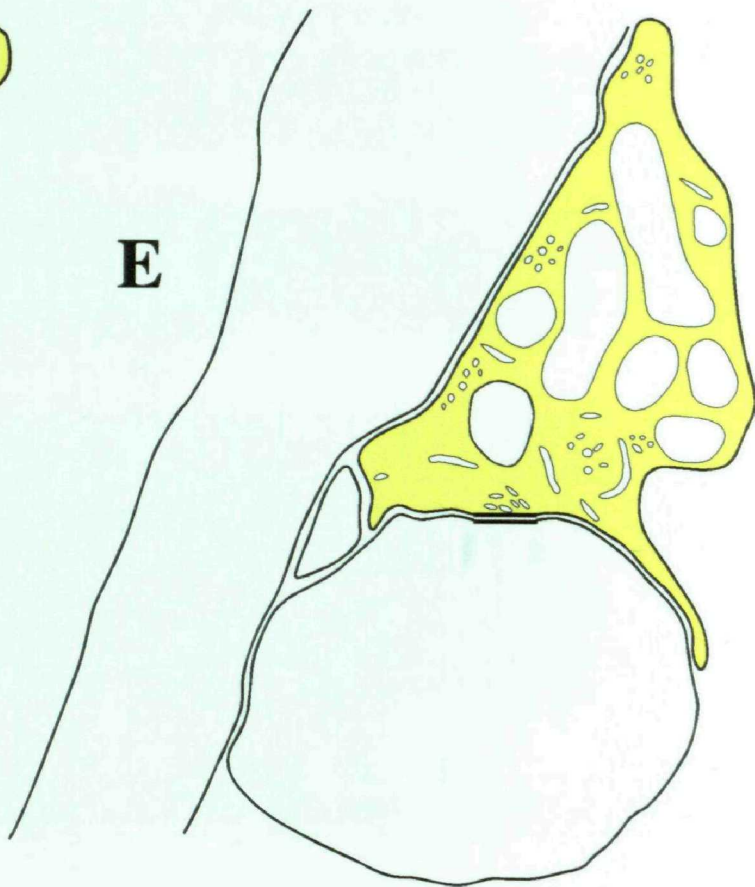
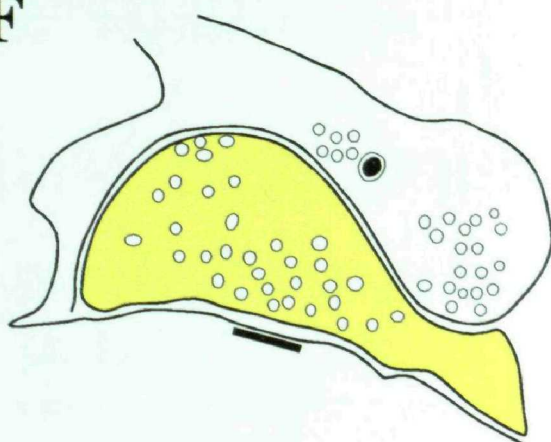
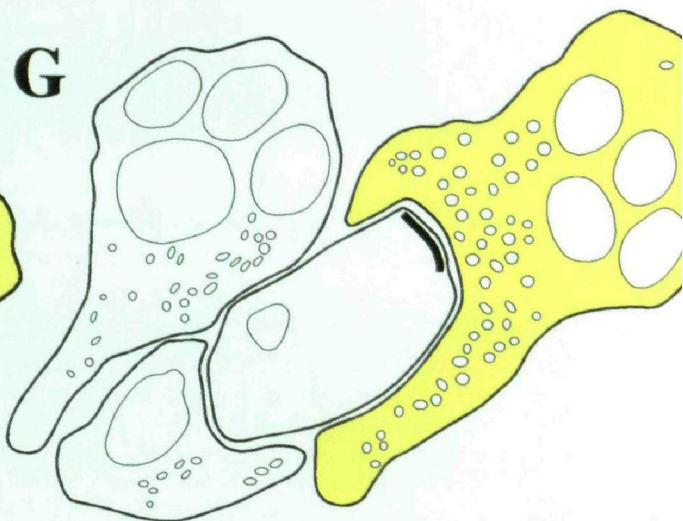
**Figura 34.** Dibujos esquemáticos de fotografías de microscopía electrónica representando diferentes modelos de relación sináptica establecida por las terminales marcadas. La secuencia **A** a **C**, correspondiente a diferentes imágenes de terminales, podría representar una secuencia en el tiempo de cómo una terminal se invaginaría en el axón adyacente. Las figuras **D**, **E** y **F** muestran terminales marcadas en aposición simultánea sobre distintas estructuras. Las sinapsis de tipo asimétrico se indican como una barra ancha en la estructura postsináptica, mientras que las sinapsis de tipo simétrico se representan como dos líneas más finas paralelas en el punto de contacto.

**A****B****D****C****E****F**



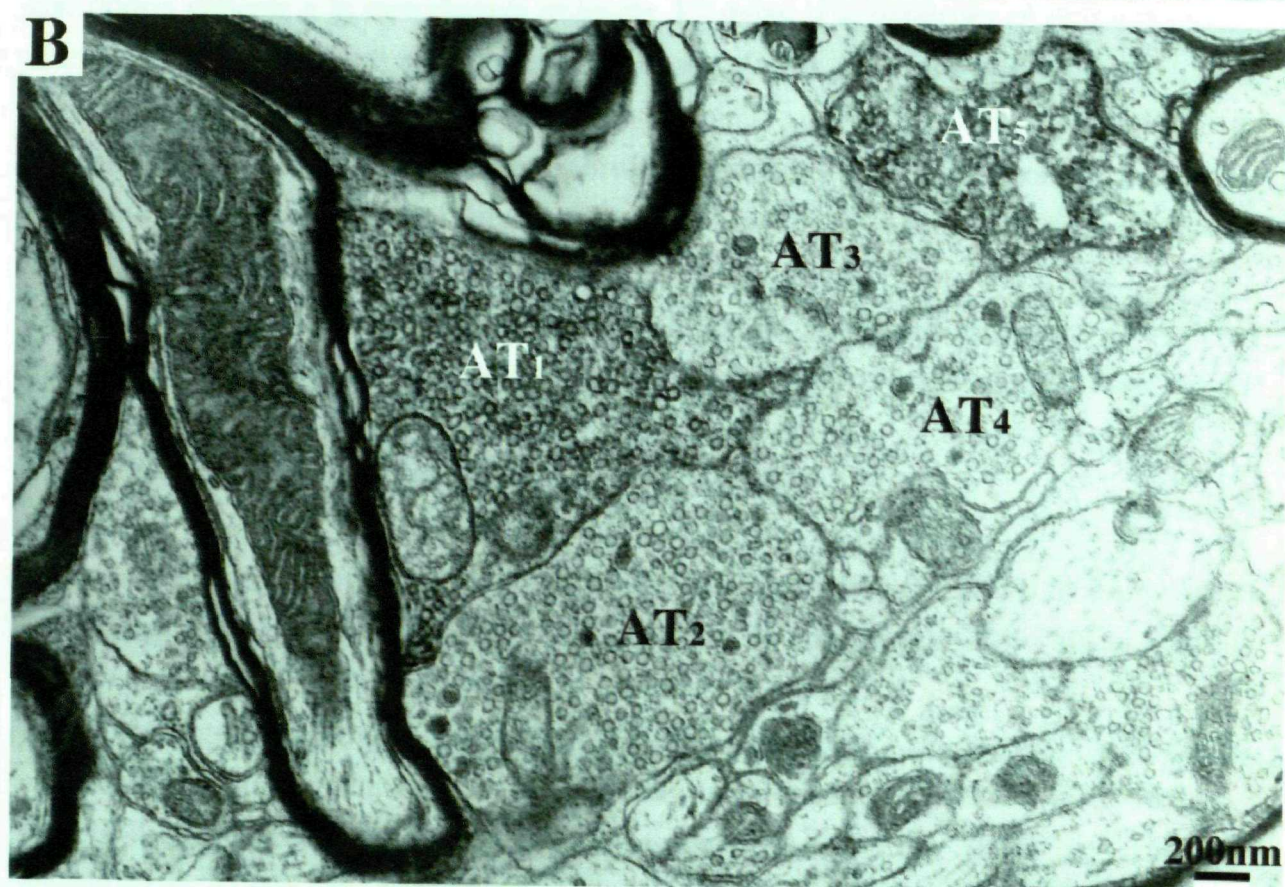
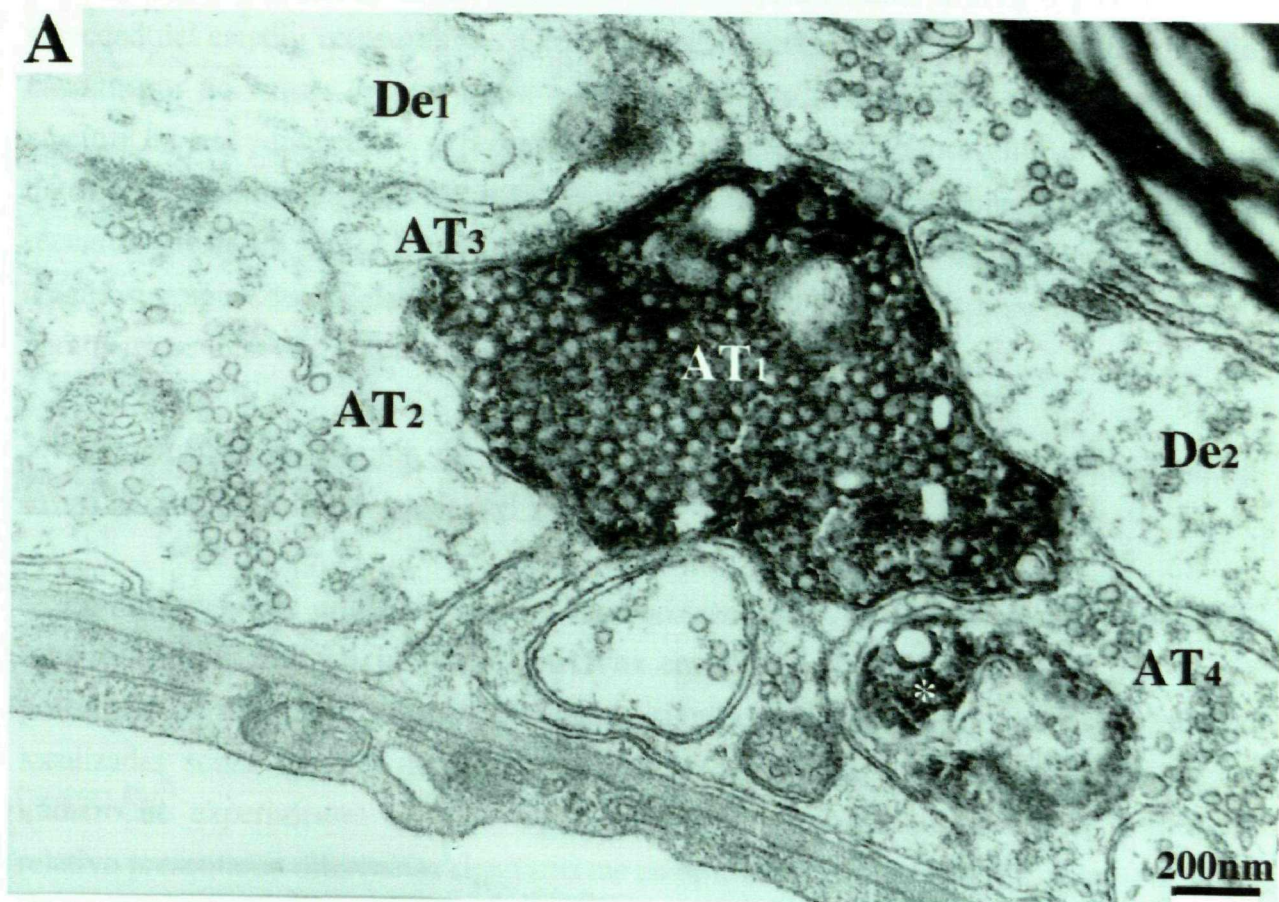
**Figura 35.** Continuación de los dibujos esquemáticos de fotografías tomadas en el microscopio electrónico representando diferentes modelos de relación sináptica establecida por las terminales marcadas. La figura **A** muestra una terminal nerviosa marcada que casi rodea por completo a la dendrita postsináptica (y cuya imagen corresponde a la figura 25A). **B, D y E** muestran una terminal marcada en aposición sobre distintas estructuras, mientras que en **G** se aprecia una dendrita que recibe una terminal marcada y dos no marcadas. **C** representa una situación frecuente en que una terminal marcada de tipo asimétrico, presumiblemente excitatoria, se encuentra junto a una terminal no marcada de tipo simétrico, presumiblemente inhibitoria. Nuevamente las sinapsis de tipo asimétrico se indican como una barra ancha en la estructura postsináptica, mientras que las sinapsis de tipo simétrico se representan como dos líneas más finas paralelas en el punto de contacto.



**A****B****C****D****E****F****G**

**Figura 36.** Esta imagen muestra otro tipo de relaciones establecidas por terminales marcadas. En la figura **A**, se aprecia una terminal axónica con el trazador BDA (AT1) en compleja relación con otras terminales axónicas (AT2, 3 y 4) y dendritas no marcadas (De1 y 2). Se marca con un asterisco la estructura marcada con BDA probable invaginación de AT1 en AT4. En la imagen **B** se observan dos terminales axónicas marcadas con BDA (AT1 y 5) adyacentes a axones no marcados (AT2, 3 y 4).







descripción de las terminales en el apartado 1), entre área mitocondrial y porcentaje de área mitocondrial (utilizándose en este caso sólo los datos procedentes de G1191 y G1197, con la salvedad del estudio comparativo de las terminales localizadas en un nivel rostral, medio o caudal, por no existir de otro modo suficiente número de terminales en cada grupo para efectuar un test paramétrico) y porcentaje de aposición (utilizándose en este caso sólo los datos correspondientes a G1155 y G1191), como se indica en el apéndice estadístico. Se recuerda que de los cuatro grupos de terminales estudiadas, se han incluido en cada análisis aquellos grupos donde había un número suficiente de terminales para realizar los tests paramétricos (test t de Student no pareado de dos colas y ANOVA).

### 3.1. Diferencias en función de la localización de la terminal (respecto al lugar de la inyección o al nivel rostro-caudal del VRPO)

En las *terminales situadas sobre las neuronas marcadas*, la **longitud de aposición** mostró siempre **diferencias significativas** en función de su localización (Tabla 8). El porcentaje de aposición mostró diferencias significativas solamente en las terminales localizadas sobre soma y dendrita proximal. Respecto a las mitocondrias, aunque su número no experimentó cambios significativos, el área mitocondrial y su porcentaje relativo presentaron diferencias significativas en función de su localización rostro-caudal y ello podría deberse a la metodología utilizada. Es decir, a la inclusión en este estudio del animal G1155 que mostró estas diferencias respecto a los otros dos animales estudiados, como se ha descrito previamente (Tabla 5) y al número variable de datos procedentes de cada uno de los animales en los distintos niveles estudiados. En relación con la localización ipsi-contralateral, solamente el área mitocondrial mostró diferencias significativas en las terminales localizadas sobre dendritas marcadas del neuropilo.

En cuanto a las características ultraestructurales de las *terminales marcadas*, sus valores medios **no** presentaron **diferencias significativas** respecto a su localización rostro-caudal.

### 3.2. Diferencias en función de la estructura postsináptica

En las *neuronas marcadas*, **no** hubo **diferencias significativas** (con una pequeña excepción) entre las características ultraestructurales de las terminales localizadas sobre el *soma* y las localizadas sobre las *dendritas proximales* (Tabla 7).

Sin embargo, exceptuando el porcentaje del área mitocondrial, los valores medios de las características ultraestructurales de las *terminales localizadas sobre las dendritas marcadas* mostraron **diferencias significativas respecto al diámetro** medio de la dendrita postsináptica (Tabla 7). Estas diferencias, aunque de menor valor, fueron también observadas en las *terminales marcadas sobre dendritas no marcadas*.

**Tabla 5:** Datos cuantitativos de las **terminales localizadas sobre neuronas marcadas en el vRPO** (que proyectan a RMc):

ESTRUCT POSTSNP	ANIMAL (n° term)	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		Lap (μm)	ADHESIÓN		% TERM AP. TERM	DIÁM DEND POST
		Área (μm2)	Perím. (μm)		Área (μm2)	% ár mitoc		%aposic	Zona act(μm)		
Soma y dend prox	<u>T.snp y nosnp</u>										
	G1155 (n=137)	0,63±0,42	3,67±1,24	1,90±2,33	0,08±0,09***++	10,53±10,25***++	1,16±0,56	31,61±9,22		44,52%	
	G1191 (n=166)	0,64±0,45	3,76±1,42	2,27±2,46	0,13±0,15	17,35±13,79	1,13±0,56	30,09±10,51*		48,79%	
	G1197 (n=179)	0,65±0,49	3,93±1,56	2,03±2,48	0,12±0,16	15,31±14,62	1,27±0,63	32,79±9,97		44,13%	
	<u>T.sinápticas</u>										
	G1155 (n=36)	0,64±0,44	3,79±1,30	2,17±3,01	0,07±0,09***++	9,57±10,01***++	1,36±0,60	35,68±7,40	0,23±0,10		
	G1191 (n=37)	0,73±0,43	3,89±1,25	2,76±3,18	0,15±0,16	17,62±13,15	1,26±0,59	32,22±9,82	0,21±0,06		
	G1197 (n=42)	0,81±0,52	4,44±1,34	3,05±3,31	0,18±0,18	18,67±12,83	1,55±0,53	35,80±8,84	0,23±0,11		
	<u>T.snp y nosnp</u>										
Dend en neuropilo	G1191 (n=171)	0,71±0,57	3,94±1,70	1,81±2,18	0,11±0,14	14,06±16,06	0,92±0,63	23,65±10,35		56,72%	2,12±1,21
	G1197 (n=82)	0,63±0,48	3,72±1,38	1,77±2,38	0,12±0,19	13,49±14,03	0,92±0,48	25,72±11,18		60,97%	1,94±0,80
	<u>T.sinápticas</u>										
	G1191 (n=46)	0,77±0,53	4,21±1,65	1,96±1,78	0,12±0,14	14,81±12,81	0,96±0,57	22,66±8,79	0,24±0,08		1,87±1,21
	G1197 (n=19)	0,70±0,44	4,18±1,35	2,05±2,09	0,14±0,16	17,05±14,18	1,14±0,53	27,95±10,95	0,22±0,10		1,76±0,85

Las diferencias estadísticamente significativas entre las terminales axónicas de los distintos animales se representan: \*: diferencias (dif) entre G1155 y G1191; +: dif G1155 vs. G1197; \*: dif G1191 vs. G1197. Un solo símbolo: p<0.05; dos símbolos: p<0.01; tres símbolos: p<0.001.

(Recordemos que el grupo de las terminales con sinapsis sobre dendrita en neuropilo no fue analizado al no poder realizar un test paramétrico)

(Estruct. Postsnp.: Estructura postsináptica; Term: Terminal; Snp: Sinápticas; Perim: Perímetro; % ár mitoc: Porcentaje de área mitocondrial; Lap: Longitud de aposición; %aposic: Porcentaje de aposición de la terminal; Zona act: Zona activa; % term ap. term: Porcentaje de terminales en aposición con otras terminales; Diám dend post: Diámetro dendrita postsináptica; Dend: Dendrita.)

**Tabla 6:** Datos cuantitativos de las terminales marcadas (que proceden de RMc) sobre las neuronas en el vRPO:

ESTRUCT. POSTSNP.	ANIMAL (n° term)	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		Lap (μm)	ADHESIÓN %aposic	Zona act (μm)	% TERM AP. TERM	DIÁMDEND POST
		Área (μm <sup>2</sup> )	Perím. (μm)		Área (μm <sup>2</sup> )	% ármitoc					
Soma y dend prox	<u>T.snp y nosnp.</u>										
	G1191 (n=16)	0,81±0,64	4,04±1,51	2,44±3,50	0,15±0,19	12,34±11,52	1,19±0,63	29,42±11,36		47,0%	
	G1197 (n=2)	0,47±0,13	3,14±0,34	1,50±0,71	0,10±0,08	19,55±12,76	1,19±0,03	38,17±5,03			
Dend en neuropilo	<u>T.snp y nosnp.</u>										
	G1191 (n=131)	0,81±0,57	4,44±1,56	2,12±2,11	0,13±0,14	13,12±10,84	1,17±0,61	26,11±8,78		47,32%	1,94±1,08*
	G1197 (n=61)	0,96±0,96	4,92±2,60	2,82±3,28	0,16±0,23	14,32±11,99	1,36±0,85	28,47±10,49		52,45%	1,60±0,99
	<u>T.sinápticas</u>										
	G1191 (n=38)	0,91±0,38	4,68±1,08	2,61±2,03	0,15±0,10	15,86±9,43	1,21±0,48	25,91±8,66	0,25±0,08		1,78±1,00
	G1197 (n=8)	2,01±1,98	6,85±4,08	5,75±5,97	0,35±0,33	16,54±13,87	1,40±0,80	21,97±8,88	0,34±0,16		1,76±0,88

Las diferencias estadísticamente significativas entre animales en las terminales no sinápticas marcadas sobre dendrita en neuropilo se señalan con el símbolo \*.

No se hizo un estudio comparativo sobre las terminales marcadas sobre soma y dendrita proximal debido al escaso número observado.

(Estruct. Postsnp.: Estructura postsináptica; T. o Term: Terminal; Snp: Sinápticas; Perím: Perímetro; % ármitoc: Porcentaje de área mitocondrial; Lap: Longitud de aposición; %aposic: Porcentaje de aposición de la terminal; Zona act: Zona activa; % term ap. term: Porcentaje de terminales en aposición con otras terminales; Diám dend post: Diámetro dendrita postsináptica; Dend: Dendrita.)



**Tabla 7: Datos cuantitativos de las terminales en función de su estructura postsináptica:**

ESTRUCT. POSTSNP.	Soma/ Dend prox <u>T.snp y nosnp</u>	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		Lap (μm)	ADHESIÓN	
		Área (μm <sup>2</sup> )	Perím. (μm)		Área (μm <sup>2</sup> )	% ár mitoc		%aposisic	Zona act (μm)
Soma/dend proximal de neur marc	Soma (n=296)	0,63±0,44	3,80±1,38	2,21±2,56	0,13±0,16	17,18±14,46	1,20±0,57	31,28±9,88	
	Dend proximal (n=182)	0,66±0,48	3,79±1,51	1,85±2,19	0,12±0,15	14,81±13,88	1,17±0,62	29,88±10,07	
	<u>T. sinápticas</u>								
	Soma (n=67)	0,72±0,49	4,03±1,29	2,90±3,42	0,16±0,18	15,54±13,04	1,45±0,56	35,75±8,38*	0,21±0,10
	Dend proximal (n=44)	0,75±0,45	4,11±1,38	2,35±2,76	0,17±0,17	19,07±12,87	1,33±0,61	31,60±8,96	0,24±0,08

Las diferencias estadísticamente significativas entre terminales somáticas y dendríticas se señalan con el símbolo \*.

ESTRUCT. POSTSNP.	Diám dend postsináptica	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		ADHESIÓN	
		Área (μm <sup>2</sup> )	Perím. (μm)		Área (μm <sup>2</sup> )	% ár mitoc	Lap (μm)	%aposisic
Term sobre dend en neuropilo de neur marc	Menos de 1μm (n=44)	0,49±0,29*++	3,13±1,08***++	1,02±1,11++	0,07±0,07+	11,50±12,20	0,53±0,28***++	17,33±7,23***++
	Entre 1 y 2μm (n=82)	0,69±0,52	3,98±1,60	1,63±1,88	0,10±0,13	14,08±18,52	1,00±0,61	25,94±11,15
	Más de 2μm (n=118)	0,74±0,59	4,02±1,71	2,00±2,36	0,12±0,16	13,53±13,60	1,02±0,60	25,93±10,25
Term marc sobre dend en neuropilo	Menos de 1μm (n=39)	0,65±0,46*	3,97±1,75*	1,38±1,10***	0,08±0,09*	11,45±10,33	0,88±0,58***++	22,55±8,78***++
	Entre 1 y 2μm (n=89)	0,96±0,89	4,90±2,27	3,01±3,05**	0,16±0,19	14,49±10,59	1,32±0,79	27,12±9,67
	Más de 2μm (n=62)	0,83±0,52	4,51±1,47	1,90±1,99	0,13±0,17	12,92±12,02	1,31±0,55	29,14±8,51

Las diferencias estadísticamente significativas entre las terminales localizadas sobre dendritas de diferente diámetro se representan: \*: diferencias (dif) <1 vs. 1-2μm; +: dif <1μm vs. >2μm; \*: dif entre terminales sobre dendrita entre 1-2μm vs. >2μm. Un solo símbolo, en negro: p<0.08; en magenta: p<0.05; dos símbolos: p<0.01; tres símbolos: p<0.001.

(Estruct. Postsnp.: Estructura postsináptica; T o Term: Terminal; Snp: Sinápticas; Perim: Perímetro; % ár mitoc: Porcentaje de área mitocondrial; Lap: Longitud de aposición; %aposisic: Porcentaje de aposición de la terminal; Zona act: Zona activa; Dend: Dendrita.)

**Tabla 8:** Datos cuantitativos de las terminales en función de su **localización** (respecto al lugar de inyección o al nivel rostro-caudal del vRPO)

ESTRUCT. POSTSNP.	Ipsi/ Contralateral	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		ADHESIÓN		DIÁM DEND POST
		Área (µm <sup>2</sup> )	Perím. (µm)		Área (µm <sup>2</sup> )	% ármitoc	Lap (µm)	%aposic	
Soma/dend proximal de neur marc	Ipsilateral (n=348)	0,64±0,44	3,81±1,39	1,99±2,36	0,12±0,15	15,81±14,36	1,24±0,59**	32,70±9,20***	
	Contralat. (n=130)	0,65±0,49	3,76±1,53	2,29±2,60	0,13±0,16	17,06±14,09	1,06±0,57	28,28±10,37	
Dend en neuropilo de neur marc	Ipsilateral (n=147)	0,72±0,57	3,99±1,70	2,03±2,33	0,13±0,18*	15,44±17,04	0,99±0,65*	24,99±11,13	1,99±1,04
	Contralat. (n=106)	0,64±0,50	3,69±1,44	1,47±2,08	0,09±0,13	11,70±12,56	0,84±0,46	23,39±9,91	2,15±1,16

Las diferencias estadísticamente significativas entre las terminales ipsi- y contra- laterales se señalan con el símbolo \*.

ESTRUCT. POSTSNP.	Nivel de vRPO	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		ADHESIÓN		DIÁM DEND POST
		Área (µm <sup>2</sup> )	Perím. (µm)		Área (µm <sup>2</sup> )	% ármitoc	Lap (µm)	%aposic	
Term sobre soma/dend proximal de neur marc	Rostral (n=167)	0,65±0,45	3,79±1,44	2,19±2,45	0,13±0,15**	16,75±14,00**	1,11±0,57++	29,22±10,28+++	
	Medio (n=86)	0,60±0,40	3,56±1,14	1,99±2,50	0,08±0,09*	11,36±10,49	1,04±0,44***	30,84±8,69*	
	Caudal (n=226)	0,65±0,48	3,89±1,51	2,02±2,39	0,12±0,15	14,32±13,85	1,32±0,65	34,03±9,85	
Term marc sobre dend en neuropilo	Rostral (n=93)	0,87±0,69	4,64±2,03	2,38±2,39	0,14±0,16	12,81±10,60	1,26±0,80	26,77±9,34	1,95±1,10**
	Medio (n=28)	1,07±1,19	5,25±2,86	3,17±3,79	0,16±0,22	14,61±12,26	1,36±0,72	27,82±11,48	1,34±0,69*
	Caudal (n=69)	0,75±0,43	4,25±1,23	1,96±2,03	0,13±0,17	13,95±11,63	1,13±0,50	26,54±8,59	1,88±1,10

Las diferencias estadísticamente significativas entre las terminales localizadas en los diferentes niveles del vRPO se representan: \*: diferencias (dif) rostral/medio; ++: dif rostral/caudal; \*: dif medio/caudal. Un solo símbolo: p<0.05; dos símbolos: p<0.01; tres símbolos: p<0.001.

(Estruct. Postsnp.: Estructura postsináptica; Term: Terminal; Perím: Perímetro; % ármitoc: Porcentaje de área mitocondrial; Lap: Longitud de aposición; %aposic: Porcentaje de aposición de la terminal; Diám dend post: Diámetro dendrita postsináptica; Dend: Dendrita.)



**Tabla 9:** Análisis comparativo entre las terminales procedentes del RMc y las terminales de origen diverso:

ORIGEN DE LA TERM	Grupo de terminales <u>T<sub>snp</sub> y no<sub>snp</sub></u>	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		Lap (μm)	ADHESIÓN		DIÁM DENDPOST
		Área (μm2)	Perím. (μm)		Área (μm2)	% ár mitoc		% aposic	Zona act(μm)	
Diverso	Term sobre dend marc (n=253)	0,69±0,54**	3,87±1,60***	1,79±2,24*	0,11±0,16	13,87±15,41	0,92±0,58***	24,32±10,65**		2,06±1,10*
RMc	Term marc sobre dend (n=190)	0,86±0,72	4,59±1,96	2,34±2,55	0,14±0,17	13,50±11,20	1,23±0,70	26,84±9,38		1,84±1,06
	<u>T sinápticas</u>									
Diverso	Term sobre dend marc (n=46)	0,75±0,51*	4,20±1,56*	1,98±1,86*	0,13±0,14	15,46±13,15	1,02±0,56*	24,20±9,69	0,23±0,09	1,84±1,11
RMc	Term marc sobre dend (n=65)	1,10±0,95	5,06±2,06	3,15±3,22	0,18±0,18	15,97±10,15	1,24±0,54	25,30±8,71	0,27±0,10	1,78±0,97

Las diferencias estadísticamente significativas entre las terminales de origen diverso y las terminales cuyas neuronas de origen se sitúan en RMc se señalan con el símbolo \*.

(Estruct. Postsnp.: Estructura postsináptica; T o Term: Terminal; Snp: Sinápticas; Perím: Perímetro; % ár mitoc: Porcentaje de área mitocondrial; Lap: Longitud de aposición; %aposic: Porcentaje de aposición de la terminal; Zona act: Zona activa; Diám dend post: Diámetro dendrita postsináptica; Dend: Dendrita.)



**Tabla 10:** Datos de caracterización cuantitativa y cualitativa de las terminales en función del **tipo de contacto sináptico** que establecen:

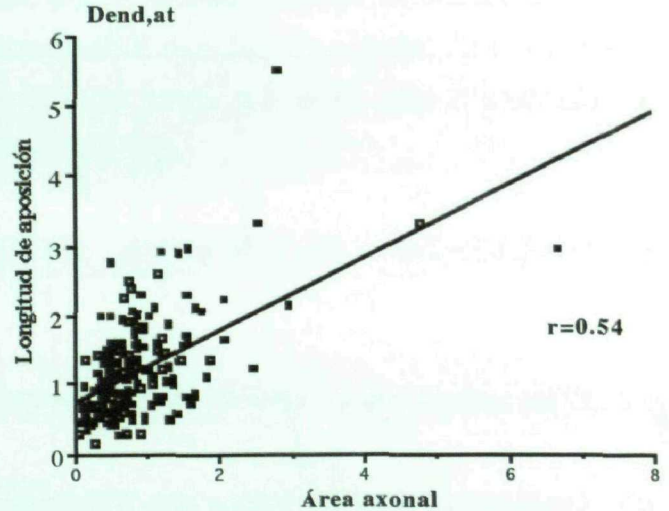
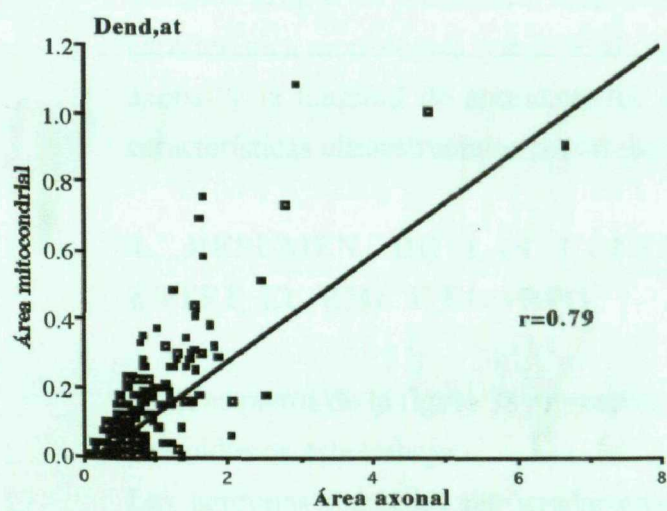
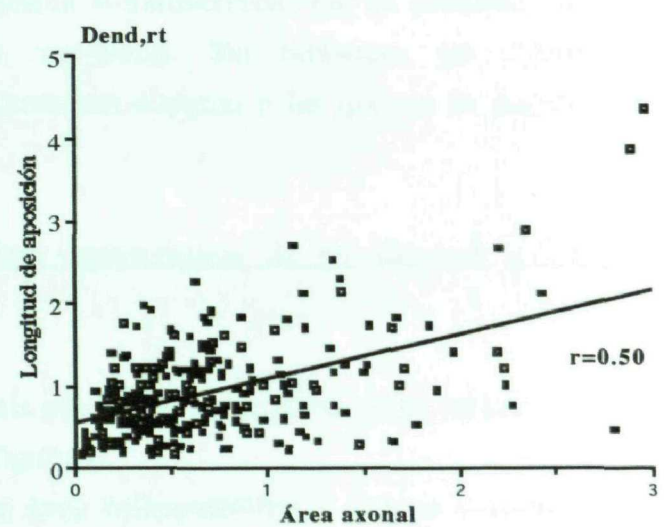
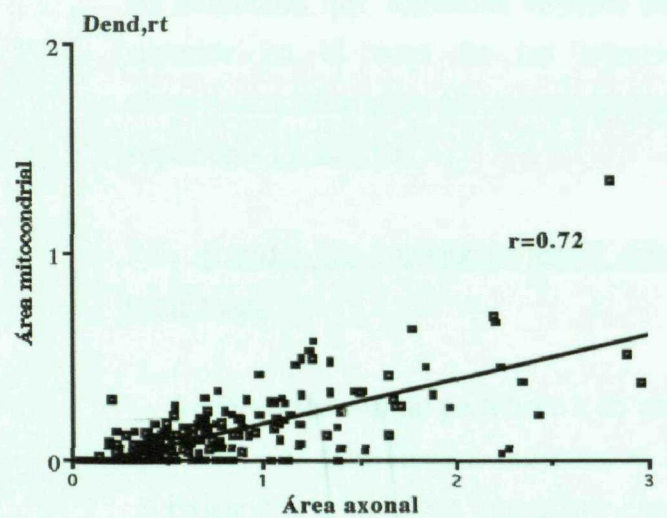
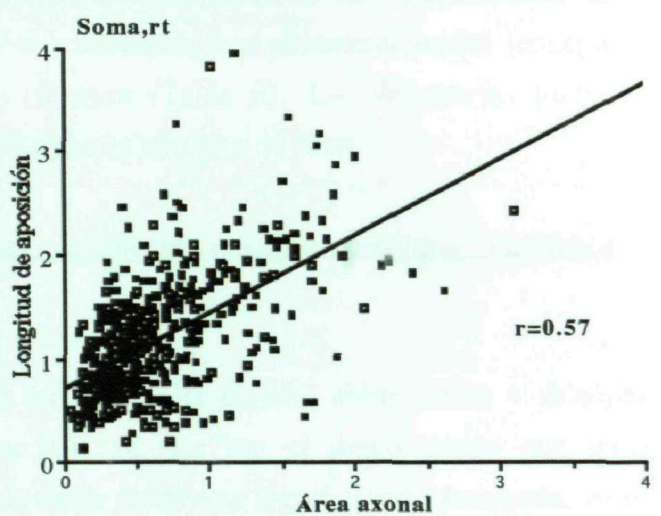
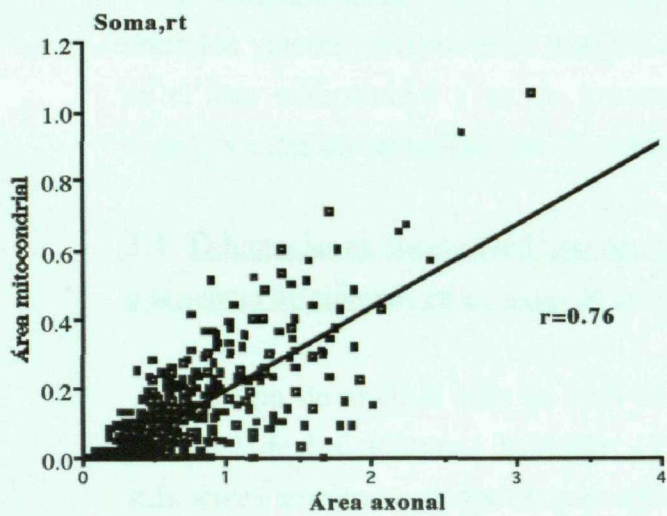
ESTRUCT. POSTSIN.	TIPO DE CONTACTO	TAMAÑO TERM		Número	MITOCONDRIAS		
		Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perím. ( $\mu\text{m}$ )		Área ( $\mu\text{m}^2$ )	% ár mitoc	Lap ( $\mu\text{m}$ )
Soma/dend proximal de neur marc	Simétrico (n=52)	0,82±0,59 <sup>+++</sup>	4,33±1,49 <sup>+++</sup>	2,98±3,19 <sup>++</sup>	0,19±0,22 <sup>++</sup>	18,15±12,48	1,45±0,64 <sup>+++</sup>
	Asimétrico (n=112)	0,67±0,43 <sup>*</sup>	3,95±1,29 <sup>**</sup>	2,21±2,63	0,14±0,15	17,16±12,85	1,32±0,52 <sup>***</sup>
	No existe (n=126)	0,53±0,35	3,41±1,24	1,83±2,05	0,11±0,12	16,99±16,28	1,00±0,51

La clasificación simétrica/asimétrica se ha realizado teniendo en cuenta solamente la presencia o ausencia de densidad citoplasmática en la estructura postsináptica. Las diferencias entre los distintos tipos de terminales se representan: <sup>\*</sup>: diferencias (dif) entre terminales simétricas (sim) y asimétricas (asim); <sup>+</sup>: dif sim vs. no existe; <sup>\*</sup>: dif asim vs. no existe. Un solo símbolo: p<0.05; dos símbolos: p<0.01; tres símbolos: p<0.001.

(Estruct. Postsnp.: Estructura postsináptica; Term: Terminal; Perím: Perímetro; % ár mitoc: Porcentaje de área mitocondrial; Lap: Longitud de aposición; Dend: Dendrita)

**Figura 37.** Diagramas de correlación entre área mitocondrial, (a la izquierda), longitud de aposición, (a la derecha), y el área de las terminales axónicas. Se muestran en gráficas independientes las terminales sobre los distintos grupos de terminales: sobre soma y dendrita proximal de neurona marcada (soma,rt), sobre dendrita marcada en neuropilo (dend, rt) y las terminales marcadas sobre dendrita en neuropilo (dend, at).

Diagramas de correlación en terminales de los distintos grupos:





### 3.3. Diferencias entre las terminales procedentes del RMc y las terminales de origen diverso localizadas sobre las neuronas marcadas

Al comparar ambos tipos de terminales, se detectaron **diferencias significativas** entre los valores medios de **la mayoría** de sus características ultraestructurales (excepto en el área mitocondrial y en su porcentaje relativo) (Tabla 9). Las diferencias fueron menores entre las terminales que formaban sinapsis en el plano de corte.

### 3.4. Diferencias en función del tipo de contacto establecido (sinapsis simétrica, asimétrica o ausencia de sinapsis en el plano de corte)

Este tipo de análisis sólo se hizo en las terminales localizadas sobre soma y dendrita proximal de las neuronas marcadas (Tabla 10), ya que era el único grupo que tenía suficientes terminales sinápticas para ello. La única diferencia significativa observada, entre las terminales que formaban sinapsis **simétrica o asimétrica**, fue su **tamaño**, que era superior en el caso de las terminales simétricas. Sin embargo, las diferencias ultraestructurales entre las terminales que formaban sinapsis y las que no lo hacían eran superiores (Tabla 10).

### 3.5. Estudio de correlación entre diferentes características de los distintos grupos de terminales:

Aunque este estudio pertenece a un análisis estadístico descriptivo, se ha incluido en este apartado. Los diagramas se muestran en la figura 37.

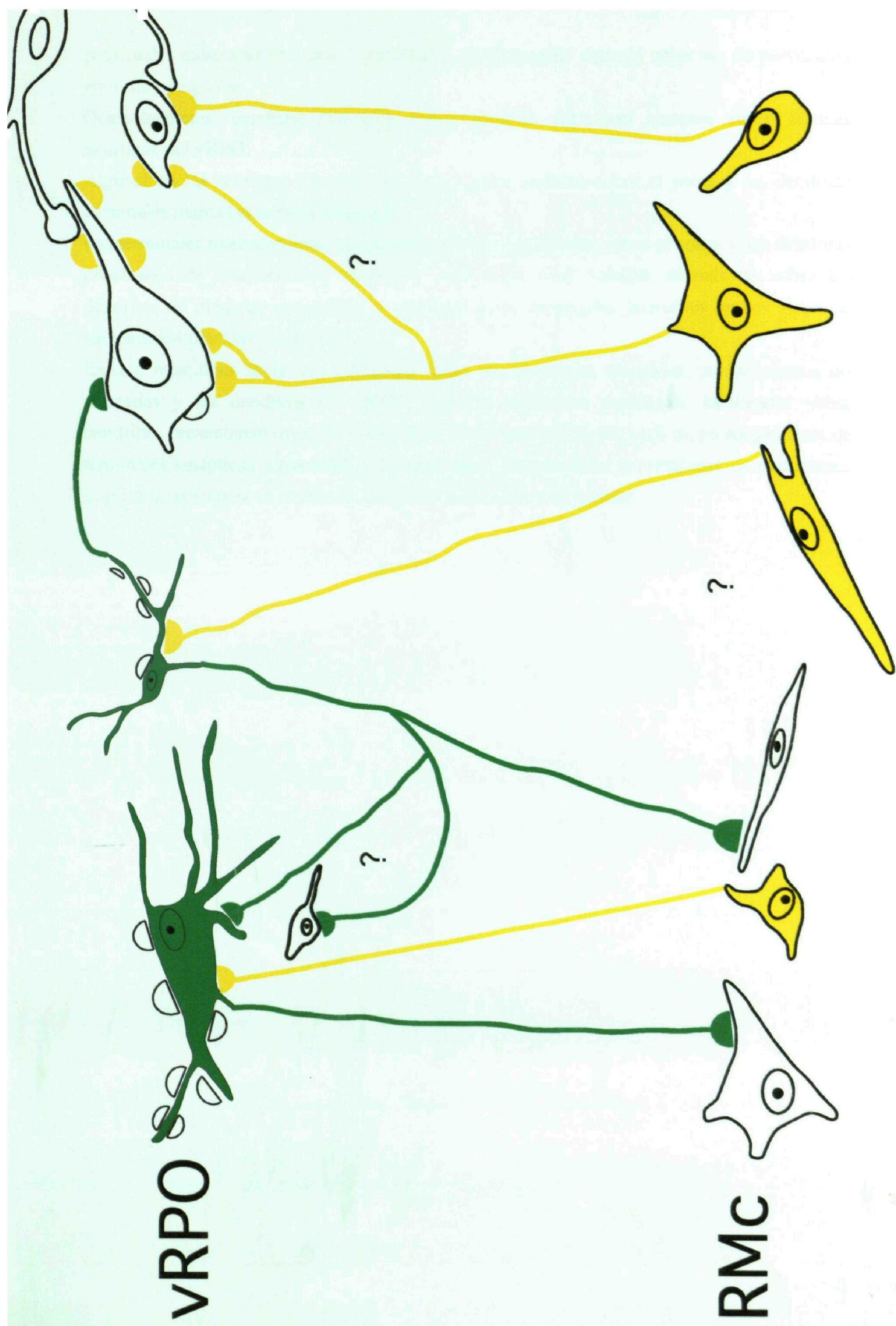
Existe una correlación importante entre el **área mitocondrial** y el **área axonal** en los distintos grupos de terminales, indicando que el área ocupada por las mitocondrias es una característica morfológica que depende del tamaño de la terminal. La correlación entre el área axonal y la longitud de aposición fue más baja en todos los casos. En el resto de las características ultraestructuras la correlación fue muy baja.

## **4. RESUMEN DE LAS CONEXIONES RECÍPROCAS ESTABLECIDAS ENTRE EL RMc Y EL vRPO.**

El esquema de la figura 38 representa un resumen de algunos de los principales resultados obtenidos en este trabajo:

Las neuronas marcadas retrógradamente constituyen una población muy heterogénea. Su tamaño, morfología y la frecuencia de las terminales localizadas sobre el soma y las dendritas

**Figura 38.** Representación esquemática de las relaciones recíprocas establecidas entre vRPO y RMc. En verde, las neuronas marcadas retrógradamente en vRPO y en amarillo las neuronas de RMc que envían sus axones de proyección hasta vRPO (recordemos que las inyecciones del trazador neuronal se efectuaron en RMc). Obsérvese cómo neuronas de una gran variedad morfológica reciben (lado derecho: grandes, medianas y pequeñas) y envían (lado izquierdo de la figura: medianas y pequeñas) conexiones desde y hacia RMc. Nótese también cómo algunas de las terminales nerviosas marcadas observadas podrían corresponder a dendritas de neuronas de proyección a RMc o a colaterales axónicas.





proximales mostraban una gran variabilidad. Curiosamente algunas neuronas de proyección eran muy pequeñas.

Ocasionalmente, dendritas marcadas retrógradamente formaban sinapsis sobre algunas neuronas del vRPO.

Algunas de las neuronas marcadas retrógradamente recibían sobre el soma y las dendritas terminales marcadas anterógradamente.

Las terminales marcadas anterógradamente estaban localizadas sobre el soma y las dendritas proximales de neuronas con tamaño y morfología muy variable además de sobre las dendritas de diámetro intermedio y pequeño; estas terminales formaban ambos tipos de sinapsis, asimétricas y simétricas.

Existen relaciones sinápticas complejas entre las terminales marcadas, las terminales no marcadas y las dendritas del vRPO. Algunas terminales marcadas, localizadas sobre dendritas, presentaban invaginaciones de su membrana producidas por las prolongaciones de terminales sinápticas adyacentes y no marcadas. La presencia de vesículas de endocitosis implica la existencia de contactos sinápticos entre ambas terminales.

**V.**

## **Discusión**

## DISCUSIÓN

Como se ha indicado en la introducción, no existen antecedentes en la literatura acerca de las características ultraestructurales de las conexiones entre el vRPO y el RMc. Sí existen estudios a nivel de microscopía óptica de las conexiones entre estos dos núcleos con los que nuestros hallazgos están de acuerdo en líneas generales.

Luppi y col. (1988) estudiaron las conexiones entre vRPO y RMc utilizando toxina colérica como trazador y Reinoso-Suárez y col. (1994) y Lai y col. (1999) utilizando peroxidasa conjugada a la aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA). Luppi y col. (1988) y Lai y col., (1999) hicieron las inyecciones en la formación reticular bulbar y Reinoso-Suárez y col. (1994) en el vRPO. Como señalan Luppi y col. (1988) y Reinoso-Suárez y col. (1994) encontramos que estas conexiones son bilaterales con una preponderancia de las ipsilaterales. En el estudio de Lai y col., (1999) también describen conexiones bilaterales y, aunque resaltan la importancia de las conexiones contralaterales, insisten en el hecho de que las conexiones desde la parte caudal del núcleo reticular oral del puente son más abundantes en el lado de la inyección. Es en esta parte caudal del vRPO donde nosotros hemos encontrado el mayor número de neuronas marcadas en el lado de la inyección bulbar.

### I. Consideraciones metodológicas

#### 1. Lugar de inyección

Los tres gatos utilizados para este estudio tuvieron inyecciones localizadas significativamente en RMc, si bien en todos los casos se extendieron a la oliva inferior y en el trayecto de la inyección se extendieron al núcleo reticular bulbar gigantocelular. En el primer caso, la inyecciones en la oliva inferior, no creemos que hayan contaminado nuestros resultados, ya que esta formación no mantiene conexiones aferentes ni eferentes con el vRPO (Reinoso-Suárez y col., 1994). La participación del núcleo reticular bulbar gigantocelular sí podría contaminar nuestros resultados ya que él sí tiene conexiones bidireccionales con el vRPO (Reinoso-Suárez y col., 1994), pero su participación ha sido en todos los casos escasa y, por otra parte, este núcleo está también funcionalmente implicado en los mecanismos de atonía durante el sueño REM de los que se ocupa el RMc. Igualmente conocemos que el vRPO proyecta hasta las láminas I, II, VII y VIII de los segmentos cervicales, superiores torácicos (Matsuyama y col., 1997), lumbares y sacros (Matsuyama y



col., 1999), atravesando sus axones el bulbo, por lo que podrían contaminarse por la inyección en RMc. Sin embargo ello no es posible porque atraviesan el bulbo raquídeo en una situación medial y dorsal, por el fascículo longitudinal medial, lejos del lugar de la inyección del trazador en el RMc y del paso de la aguja de inyección.

Por otro lado el tamaño de nuestras inyecciones permitió una adecuada captación del trazador por parte de los somas neuronales y terminales axónicas del área inyectada, y a pesar de que el depósito principal del mismo tuvo una localización algo diferente dentro del RMc en los distintos animales (medial en G1155, lateral en G1191 y central en G1197), apenas existieron diferencias significativas en los resultados obtenidos como hemos observado en el capítulo anterior.

## **2. Trazadores**

Tanto el BDA como el HRP-WGA han sido profusamente utilizados para el estudio de las conexiones nerviosas entre diferentes regiones del sistema nervioso central, tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica.

La peroxidasa ha sido principalmente utilizada para el trazado de conexiones aferentes al lugar de inyección, ésto es, para el estudio de las neuronas que proyectan hacia la zona en que se efectúa el depósito del trazador, como ha sido nuestro caso. Aunque pretendimos en principio hacer un estudio de las fibras marcadas anterógradamente desde RMc en vRPO, probablemente como consecuencia de nuestro sistema de revelado, ultraestructuralmente sólo hemos podido apreciar un escaso número de terminales marcadas en el vRPO. Hemos conseguido una mayor sensibilidad en el marcaje retrógrado de las neuronas del vRPO mediante la utilización de TMB en el revelado en lugar de la diaminobenzidina (Mesulam, 1978).

La utilización de un trazador como el BDA, especialmente inyectado mediante presión, nos ha permitido obtener simultáneamente un abundante marcaje de neuronas (transporte retrógrado) y de fibras (transporte anterógrado) (Rajakumar y col., 1993). En las neuronas marcadas retrógradamente el trazador aparece en todo el árbol dendrítico, a diferencia del trazado con HRP-WGA, en que los cristales sólo aparecen a nivel de soma y dendritas proximales. Uno de los posibles riesgos de la utilización del dextrano como trazador es el del marcaje de colaterales de neuronas marcadas. El hecho de que un determinado porcentaje de las terminales marcadas anterógradamente tenga este origen es una posibilidad que no podemos descartar, más aun cuando la intensidad de trazador acumulado en las terminales axónicas estudiadas fue, aunque

no significativamente, diferente en alguna de ellas. Por otro lado, la intensidad de su marcaje hacía difícil en algún caso la identificación del tipo de vesículas y especialización sináptica de la terminal.

### **3. Estudio ultraestructural**

A la hora de analizar los resultados, como se ha señalado previamente, todo abordaje científico experimental tiene sus limitaciones. Debido a que un análisis seriado de las estructuras es incompatible con un tamaño de muestra adecuado para caracterizar las relaciones entre ambos núcleos, hemos optado por realizar un estudio ultraestructural no seriado. En relación con la frecuencia sináptica de algunas de las neuronas marcadas, se observaron distintos niveles de corte de la misma neurona. Por lo tanto, los resultados obtenidos derivan de un estudio bidimensional de las terminales, condicionado éste por el plano de corte. Aunque, debido al número elevado de terminales estudiadas, se pueden deducir datos importantes relacionados con: 1) la variedad de sus características ultraestructurales; 2) su amplia distribución; 3) la complejidad de relaciones establecidas con el soma neuronal y el neuropilo que le rodea. Sin embargo, un análisis seriado podría revelar nuevas características de las complejas relaciones sinápticas establecidas por las terminales procedentes del RMc, en el vRPO.

También es imprescindible recordar que existen determinados parámetros (como la forma de las vesículas o el tipo de contacto sináptico establecido) que pueden depender del método de fijación o del plano de corte. Respecto al estudio cuantitativo, hay que tener en cuenta la retracción del tejido debido a los métodos de fijación y de inclusión utilizados. Aunque algunos autores no corrigen estos valores (Pierce and Mendell, 1993), considerando que la retracción producida por el glutaraldehído se compensa con la expansión producida en el material marcado con HRP e incluido en resina (Hillman and Deutsch, 1978; Örnung and Ulfhake, 1990).

A pesar de que hemos de tener presentes las limitaciones anteriormente descritas, el amplio material estudiado y la sistemática de elección en el mismo desde todas las zonas del tegmento pontino ventral oral, nos permite hablar de una aproximación cuantitativa a la organización sináptica del vRPO en su relación con RMc.

## II. Conexiones entre vRPO y RMc

### 1. Neuronas del vRPO que proyectan al RMc. Trazado retrógrado.

Aunque había neuronas marcadas retrógradamente a través de toda la extensión rostro-caudal del vRPO, la mayoría de ellas se localizó en sus porciones caudales. Ésto se corresponde con el orden general descrito en la formación reticular; es decir, el mayor número de las neuronas que proyectan desde el vRPO al bulbo se sitúa de modo que el trayecto sea el más corto posible.

Las neuronas marcadas retrógradamente forman una población heterogénea y se parecen a las neuronas (tipos I y II) caracterizadas electrofisiológicamente, en el vRPO de la rata (Núñez y col., 1997). Las neuronas marcadas, con escasas dendritas primarias localizadas en polos opuestos del soma y de tamaño pequeño o intermedio, son similares a las neuronas tipo II; mientras que las neuronas marcadas multipolares, con mayor número de dendritas primarias localizadas en diferentes lugares del soma y mayor tamaño, suelen parecerse a las neuronas tipo I. De acuerdo con Núñez y col. (1997), las propiedades electrofisiológicas de la membrana son diferentes en ambos tipos de neuronas. Nuestros resultados muestran que las neuronas similares a las células tipo II, no sólo reciben pocas terminales axónicas sino que su frecuencia (número de terminales axónicas por 100µm de membrana) suele ser baja. Sin embargo las neuronas de mayor tamaño, la mayoría de las cuales se parecen a las células tipo I, reciben un alto número de terminales cuya frecuencia es generalmente alta. Ello indica una gran convergencia de información sobre las neuronas multipolares de mayor tamaño que proyectan al RMc; dichas neuronas probablemente son importantes en la integración de información funcionalmente diversa. Además el número de terminales axónicas por unidad de longitud neuronal es un importante parámetro para determinar la capacidad de respuesta de las neuronas a los estímulos recibidos. De todo lo anterior se deduce que, aunque hay excepciones, algunas características fisiológicas de las neuronas del vRPO podrían estar relacionadas con sus características morfológicas; es posible que haya alguna relación entre las diferentes propiedades de membrana observadas en los tipos celulares I y II y su frecuencia sináptica. Aunque para poder asegurar esta hipótesis es necesario estudiar la frecuencia sináptica de las neuronas que han sido registradas electrofisiológicamente. Por otra parte neuronas del mismo grupo morfológico (multipolares o bipolares), que muestran una frecuencia similar de terminales axónicas sobre el soma, presentan diferencias respecto a la proporción de los distintos tipos de terminales (con vesículas redondeadas u ovaladas; sinapsis simétricas o asimétricas)



que reciben. Estas diferencias son difíciles de discutir debido a la gran variabilidad de los parámetros observados, pero podrían explicar la existencia de subgrupos celulares con diferentes conexiones sinápticas y funciones específicas. Es decir, podrían explicar algunas diferencias de comportamiento electrofisiológico en neuronas que forman parte de un mismo grupo morfológico, como las neuronas tipo II del vRPO; el 73.7% de las mismas son depolarizadas mientras que el resto son hiperpolarizadas, por activación de los receptores muscarínicos post-sinápticos. Sin embargo, hay que considerar que la actividad electrofisiológica de una neurona depende no solamente del tipo, distribución y frecuencia de terminales sinápticas que recibe sino de otros muchos factores, como la distribución y densidad de sus receptores y canales iónicos (Mainen y Sejnowski, 1996). La discusión de nuestros resultados respecto a otras regiones de la formación reticular es difícil debido a los pocos datos existentes y a los diferentes criterios utilizados (Bowsher and Westman, 1970). Sin embargo, nuestros resultados son comparables a los obtenidos en otras regiones del sistema nervioso. En la médula espinal, la frecuencia sináptica es una característica morfológica que identifica distintos tipos de neuronas. Por ejemplo, las  $\alpha$ -motoneuronas (soma poligonal, grande y abundantes orgánulos citoplasmáticos) se diferencian de las  $\gamma$ -motoneuronas (soma oval o fusiforme, generalmente más pequeño) por su mayor frecuencia sináptica (Destombes y col., 1992). En las motoneuronas de los ganglios simpáticos la densidad de los botones axosomáticos está relacionada principalmente con el tamaño del soma (Gibbins y col., 1998). Por otra parte, las  $\alpha$ -motoneuronas también se diferencian de las  $\gamma$ -motoneuronas por el aspecto del nucleolo: mientras las primeras tienen un nucleolo vacuolado, las segundas muestran un nucleolo compacto (Destombes y col., 1992). En el vRPO, las grandes neuronas multipolares marcadas muestran un nucleolo grande que puede estar vacuolado, pero también muestran nucleolos compactos igual que el resto de neuronas marcadas. Esto es lógico, ya que las variaciones observadas en la estructura nucleolar están relacionadas con los cambios producidos en el metabolismo del ARN y en la actividad sintética de las proteínas (Goessens, 1984). Una relación entre el nivel de actividad de las neuronas y la ultraestructura de los nucleolos ha sido descrita en el núcleo supraóptico (Lafarga y col., 1991). Finalmente, del presente trabajo se deduce que las neuronas del vRPO que proyectan al RMc carecen de características ultraestructurales específicas que las diferencien del resto de neuronas del vRPO (de la Roza y Reinoso-Suárez, 2000). Ésto contrasta con otras regiones del sistema nervioso central (SNC) donde las neuronas que proyectan a una zona determinada muestran características morfológicas distintas (tamaño, forma del núcleo, retículo endoplásmico y frecuencia sináptica) a las de las neuronas vecinas (Ingham y col., 1985).

Aunque algunos perfiles marcados tienen características ultraestructurales (cisternas de retículo endoplásmico cuyos ribosomas no se ven con claridad debido al precipitado de la reacción, muy pocas vesículas sinápticas pleomórficas agrupadas en racimos junto a la membrana y ausencia de densidad postsináptica) que sugieren ser dendritas presinápticas, sólo ocasionalmente se ha observado con claridad una terminal dendrítica estableciendo sinapsis sobre una neurona. Por lo tanto, ocasionalmente, algunas de las neuronas del vRPO que proyectan al RMc establecen contactos sinápticos (a través de sus dendritas) sobre neuronas del vRPO. Precisamente algunas de las neuronas marcadas retrógradamente eran bipolares y pequeñas parecidas a las clásicas interneuronas gabérgicas, observadas en otras regiones del SNC. Además, algunas neuronas marcadas del vRPO reciben terminales marcadas (en aposición o formando sinapsis); estas terminales podrían originarse desde axones colaterales de neuronas del vRPO que proyectarían al RMc. Esta hipótesis vendría reforzada por la presencia, en el vRPO, de neuronas bipolares con axones colaterales (Núñez y col., 1998). Las neuronas del vRPO, que proyectarían simultáneamente a otras neuronas del vRPO (mediante terminales dendríticas o axónicas) y al RMc, podrían sincronizar la actividad de ambos núcleos. Esta sincronización desempeñaría un papel clave en el proceso de atonía muscular. Pero las terminales axónicas marcadas también podrían proceder del RMc.

Esta segunda hipótesis implica un sistema de regulación mutua entre ambos núcleos. Es decir la misma neurona del vRPO que envía sus axones al RMc, estaría recibiendo aferencias desde este mismo núcleo que modularían su actividad. Ya que las sinapsis simétricas han sido relacionadas en otras regiones del SNC con sinapsis inhibitoras (Peters y col., 1991), si estas terminales tuvieran este comportamiento, el RMc regularía la actividad de algunas de las neuronas de proyección del vRPO, a través de un circuito de retroalimentación negativo. Sin embargo, no todas las neuronas que proyectan al RMc recibirían este tipo de regulación, ya que sólo 4 de las 17 neuronas estudiadas ultraestructuralmente muestran las características citadas. Si bien hay que recordar nuevamente que debido a las características de nuestro estudio estamos infravalorando esta proporción.

En resumen, las terminales axónicas y dendríticas marcadas localizadas sobre neuronas (marcadas o no) de distinta morfología sugieren la existencia de distintos circuitos complejos entre las neuronas del vRPO y del RMc, que regularían la actividad coordinada de ambos núcleos. Por otra parte, estos resultados sugieren que algunas neuronas del vRPO no solamente envían información al RMc sino que también intervendrían en el procesamiento de la información local.

Algunas terminales sinápticas descritas en este trabajo estaban rodeadas por prolongaciones astrocíticas que le separaban del resto del neuropilo. El papel desempeñado por los astrocitos es muy variado (Fields y Steven, 2000): entre otras funciones, actúan como una barrera química que regula la concentración de iones y neurotransmisores liberados en el espacio que rodea a la terminal. Concretamente, los astrocitos pueden intervenir en la captación del glutamato liberado en las sinapsis glutamatérgicas (Araque y col., 1999). El hecho de que disminuya el porcentaje de terminales rodeadas por glía desde las dendritas proximales hasta las dendritas distales podría estar relacionado con diferencias en la retirada del glutamato de la hendidura sináptica; ésta podría ser una de las causas que influyan en el aumento de la fuerza sináptica en función de su distancia al soma (Spruston, 2000). La presencia de terminales glutamatérgicas en el vRPO ha sido sugerida en trabajos previos (Reinoso-Suárez y col., 1994; Rodrigo-Angulo y col., 1997; Núñez y col., 1998) y es posible que, desde el soma hasta las dendritas distales, aumente la proporción de terminales glutamatérgicas ya que aumenta el porcentaje de terminales sinápticas asimétricas (de la Roza y Reinoso-Suárez, 2000). Recientemente se ha demostrado que los astrocitos, *in vitro*, aumentan el número de sinapsis maduras en el SNC y son necesarios para el mantenimiento y estabilización de las sinapsis (Ullian y col., 2001).

El hecho de que la posición, tipo y tamaño de las neuronas marcadas sean similares en los animales inyectados con diferentes trazadores, nos hace pensar que no se produjo una captación selectiva de un trazador concreto, por parte de determinados axones terminales en el lugar de la inyección. Esta posibilidad ha sido descrita en algunas vías para la peroxidasa conjugada a la aglutinina de germen de trigo (Brushart y Mesulam, 1980), si bien esta hipótesis es minimizada en nuestros experimentos al utilizar una mezcla de HRP-WGA con peroxidasa libre (Mesulam, 1982).

Es interesante el hallazgo de una neurona no marcada junto al soma de una neurona marcada. Aunque en aumentos pequeños las membranas de ambas neuronas parecían estar muy próximas, la observación a mayor aumento reveló la existencia de una prolongación glial muy fina entre ellas; en ningún corte estudiado se observó contacto alguno entre ambas membranas. Sin embargo no parece que esta situación sea debida al azar (en el vRPO hay un número pequeño de neuronas que suelen estar dispersas) por lo que debía de existir algún tipo de relación/comunicación entre ambas que nosotros desconocemos. La existencia de oligodendrocitos adyacentes a neuronas marcadas podría tener implicaciones metabólicas, si bien como ha sido descrito por Purves et al., 1987, éstos no se encuentran junto a las neuronas de un modo permanente, sino que su posición puede variar con el tiempo.



## **2. Proyecciones del RMc hacia vRPO. Trazado anterógrado.**

Las terminales axónicas marcadas se encontraron localizadas, en toda la extensión rostro-caudal del vRPO, sobre el soma y dendritas proximales de neuronas con tamaño y morfología variable, además de sobre dendritas intermedias y pequeñas. Estos resultados demuestran una influencia directa del RMc sobre la actividad de algunas neuronas del vRPO, en diferentes lugares de la superficie neuronal. Algunas de las neuronas receptoras podrían ser interneuronas, por su tamaño pequeño y apariencia bipolar, de modo que el RMc podría actuar a través de ellas en los circuitos locales del vRPO. Otras neuronas receptoras serían de proyección y enviarían la información procedente del RMc a otros núcleos, después de procesarlas conjuntamente con el resto de aferencias que recibe. De nuestros datos también se deduce que la proyección desde el RMc es altamente divergente, ya que modularía la actividad de un grupo heterogéneo de neuronas, localizadas en toda la extensión del vRPO. Sin embargo, la proporción de las terminales procedentes del RMc sobre las neuronas del vRPO, suele ser baja respecto a las terminales de otros orígenes. Nuestros resultados muestran escasos cuerpos neuronales con terminales procedentes del RMc. Ésto puede deberse a que ambos son poco frecuentes en el vRPO.

Aunque las terminales procedentes del RMc estaban localizadas sobre dendritas de distintos tamaños, mostraban preferencia por las dendritas de tamaño intermedio. Algunos autores han considerado que la localización de una terminal sobre la superficie neuronal es un factor importante que influye en la propagación del potencial de acción (Shepherd y Koch, 1990); es decir, las sinapsis sobre las dendritas proximales e intermedias serían más eficaces que las situadas sobre las dendritas distales. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que la dependencia local de la eficacia sináptica es mínima. Concretamente, en las neuronas piramidales del hipocampo, todas las sinapsis parecen tener la misma habilidad para iniciar los potenciales de acción independientemente de su localización en el árbol dendrítico (Magee y Cook, 2000). Estos autores demuestran que la fuerza sináptica aumenta en función de la distancia del soma, aunque los mecanismos responsables no están claros. Entre las posibles causas podrían considerarse el número de vesículas liberadas, número de receptores postsinápticos, alteraciones en la captación de neurotransmisor desde la hendidura sináptica o propiedades físicas de la membrana (Spruston, 2000). De acuerdo con Cook y Johnston (1997), el efecto de cualquier sinapsis en la integración final depende de su nivel de uso y no de su localización. Además, el estado de actividad de las redes neuronales parece influir en la selección de las aferentes que recibe. Es decir, cuando las motoneuronas están en reposo, las

mismas aferencias sinápticas son procesadas de forma similar independientemente de la rama dendrítica que los recibe y tienen efectos similares sobre la descarga neuronal; pero, cuando la motoneurona está excitada discrimina las aferentes, seleccionando las mas próximas e ignorando las más distales (Korogod y col., 2000). Si algo similar ocurriese en el vRPO, los mensajes procedentes del RMc serían siempre seleccionados en las neuronas con aferentes localizadas en sus dendritas proximales. Aunque, cuando las neuronas estuviesen altamente excitadas, la influencia del RMc sobre el vRPO sería menor ya que sólo se seleccionarían las aferencias próximas al soma.

Las terminales marcadas localizadas sobre las dendritas solían tener terminales no marcadas adyacentes, que podían formar contactos de tipo simétrico o asimétrico sobre la misma dendrita. Dichas terminales estarían en una posición ideal para aumentar o reducir la información que llega al vRPO. Estos datos también sugieren que la misma información procedente del RMc podría tener diferentes efectos sobre las neuronas del vRPO, dependiendo de la naturaleza y actividad de sus terminales adyacentes.

Por otra parte, las invaginaciones entre las terminales marcadas y no marcadas y las vesículas de endocitosis (similares a las formadas en las sinapsis después de la liberación del neurotransmisor) observadas en las mismas, sugieren relaciones sinápticas entre ellas. En estas relaciones, el perfil invaginado parece ser el postsináptico ya que la vesícula de endocitosis ha sido observada en el citoplasma de la terminal que le rodeaba. La función de estas vesículas es reciclar la membrana de las vesículas sinápticas en la terminal nerviosa (Heuser, 1989; Cremona y De Camilli, 1997) y en su formación intervienen un complejo molecular de clatrina (Schmid, 1997; Gad y col., 2000) y un conjunto diverso de proteínas (Schmid y col., 1998; Brodin y col., 2000). Respecto a la naturaleza de los perfiles invaginados hay dudas ya que su forma es similar a las espinas dendríticas sin cuello descritas en el hipocampo (Lim y col., 1997), pero tienen vesículas en vez del aparato de espina y las terminales de donde proceden no tienen ribosomas. De acuerdo con Ilinsky y col. (1997) y Kultas-Ilinsky y col. (1997) las espinas de las dendritas presinápticas tienen vesículas y dichas dendritas, cuando son distales, suelen no tener ribosomas. La ausencia de ribosomas en perfiles postsinápticos con vesículas ha sido observado en dendritas presinápticas del tálamo (Ohara y Lieberman, 1993; Sato y col., 1996). Aunque algunas de las imágenes observadas en el vRPO son similares a las espinas dendríticas descritas en el tálamo (Ilinsky y col., 1997; Kultas-Ilinsky y col., 1997), es probable que dichos perfiles sean terminales axónicas que muestran en esta región

características específicas. Pero, de acuerdo con la bibliografía consultada, en el SNC no se han descrito terminales axónicas con apéndices bulbares que producen invaginaciones profundas en las terminales adyacentes. En el caso de que se tratara de dendritas presinápticas, ello implicaría que las terminales procedentes del RMc actuarían sobre algunas neuronas del vRPO directamente e indirectamente a través de las interneuronas. La inclusión de perfiles postsinápticos en el botón presináptico ha sido también observada en las aferentes talámicas de las capas V (Anderson y col., 1998) y VI de la corteza cerebral del mono (Freund y col., 1989), en los axones Y del área 18 en gatos monoenucleados (Friedlander y col., 1991) y en las fibras musgosas del hipocampo (Chicurel y Harris, 1992). De acuerdo con éstos autores, dicha disposición podría incrementar la concentración del neurotransmisor en la región que rodea la sinapsis y así incrementar la probabilidad de activación de los receptores postsinápticos.

Las terminales axónicas marcadas establecían sinapsis de ambos tipos, asimétrico y simétrico. Sin embargo el número de sinapsis asimétricas era superior sugiriendo una proyección excitatoria desde el RMc. Los contactos de tipo simétrico, menos abundantes, podrían deberse a: 1) colaterales de neuronas del vRPO que han sido marcadas retrógradamente, o de fibras de paso dañadas en el lugar de la inyección; y 2) la existencia de dos vías desde el RMc hacia el vRPO, de modo que diferentes poblaciones de neuronas, utilizando distintos neurotransmisores, desde formación reticular bulbar medial dieran lugar a varios tipos de contacto sináptico en el tegmento pontino ventral oral.

En resumen, la gran variedad de estructuras postsinápticas a las terminales marcadas y las relaciones ultraestructurales observadas entre ellas sugieren la presencia, en el vRPO, de amplios campos receptores de la información procedente del RMc que sería procesada localmente de forma compleja. Además, dicha información podría ser modificada, en los diferentes estados del ciclo vigilia-sueño, de acuerdo con la actividad de las neuronas o terminales nerviosas del vRPO relacionadas con ellas. Esta hipótesis apoya la idea del principio de multifuncionalidad de un circuito básico.

La distribución de las aferencias externas sobre las neuronas ha sido estudiada, en diferentes regiones del SNC, con el fin de conocer los mecanismos que controlan y regulan su actividad. Hay una abundante bibliografía sugiriendo que la distribución de las aferencias sobre la superficie neuronal parece estar relacionada con el origen de dichas terminales (Ralston, 1994a,b; Steriade y col., 1997; Keifer y Lustig, 2000): es



decir, las terminales procedentes de la corteza cerebral se localizan fundamentalmente sobre las dendritas distales mientras las procedentes de las vías aferentes específicas (núcleos cerebelosos u otras estructuras subcorticales) forman sinapsis sobre las dendritas proximales. Sin embargo, trabajos recientes han descrito que las aferencias procedentes de una determinada región se distribuyen ampliamente sobre el árbol dendrítico de las neuronas postsinápticas (Bevan y col., 1997) igual que ocurre en el vRPO.

Si bien la mayor parte de los axones marcados eran botones terminales, en algunas ocasiones fue posible identificar botones *en passant*; a veces, aparecían dos terminales marcadas relativamente próximas que probablemente procedían de un sólo axon. La mayoría de las relaciones sinápticas establecidas, entre botón aferente marcado y dendrita, es simple (relación 1/1). Solamente el 3,12% de las terminales marcadas estaba localizado sobre dos dendritas y, en un caso, sobre una dendrita y un cuerpo neuronal; esta proporción puede deberse al estudio no seriado utilizado.

Es de destacar también la frecuente presencia de una cisterna postsináptica de retículo endoplasmático en el caso de las terminales marcadas sobre soma, lo cual las diferenciaba de los otros grupos de terminales. Otro de los orgánulos postsinápticos observados fue una mitocondria. Las mitocondrias parecen desempeñar un papel importante en la homeostasis del calcio neuronal (Budd y col., 1996). Recientemente se ha sugerido que la captación de calcio por la mitocondria es un mecanismo importante para retirar el calcio después de repetidos potenciales de acción (Peng, 1998). Finalmente, los taxi bodies son orgánulos postsinápticos en algunas terminales asimétricas y su significado funcional no está claro. En cualquier caso en nuestro estudio hemos encontrado unos bajos porcentajes de terminales asimétricas con taxi bodies, si bien éstos aparecieron también en un 7,5% de las terminales asimétricas procedentes del RMc sobre dendrita, aunque ignoramos lo que esto pueda significar.

### 3. Estudio comparativo

Aunque las características ultraestructurales de las terminales procedentes del RMc son ampliamente variables, sus valores medios: a) son similares entre animales y respecto a su localización rostro-caudal; b) varían significativamente respecto al diámetro medio de sus dendritas postsinápticas, con algunas excepciones. De aquí se deduce que algunas características morfológicas de estas terminales deben estar en cierto modo relacionadas con su posición en el árbol dendrítico. También, en la población general de las terminales que forman sinapsis en el vRPO, algunas de sus

características ultraestructurales muestran una relación lineal con el diámetro de la dendrita postsináptica (de la Roza y Reinoso-Suárez, 2000). Los resultados del presente trabajo igualmente pueden compararse con los descritos por Pierce y Lewin (1994). De acuerdo con estos autores, las características morfológicas de los botones terminales de las fibras Ia sobre las motoneuronas varían en función de su localización (próximo-distal) dendrítica, lo cual podría representar una forma de variación sináptica sistemática en relación con la posición de contacto. Conclusiones semejantes pueden deducirse de las terminales no marcadas localizadas sobre las neuronas que proyectan al RMc, aunque hay algunas diferencias con las terminales procedentes del RMc; es decir, los valores de aposición de las primeras muestran diferencias entre animales y en función de su localización (ipsi-contralateral o rostro-caudal).

Por otra parte, la alta variabilidad observada en todas las características ultraestructurales de las terminales marcadas es similar a la observada en las terminales de origen diverso localizadas sobre neuronas marcadas. Concretamente, en los valores mitocondriales y en el área del axón, hay una gran coincidencia entre ambos tipos de terminales excepto en 2 ó 3 valores muy altos. Por lo tanto, no es posible identificar inequívocamente el origen de las terminales procedentes del RMc por sus características ultraestructurales, aunque el estudio realizado con ANOVA muestra algunas diferencias entre los valores medios de ambas poblaciones de terminales. Existe una abundante bibliografía que ha relacionado, en diferentes regiones del SNC, la apariencia morfológica de los axones terminales con su núcleo de origen (Jones y Powell, 1969; Weber y Kalil, 1987; Wong-Riley, 1972; Hamori y col., 1975; Ohara y col., 1980). Aunque también hay estudios (Pierce y Mendel, 1993; Hanley y Bolam, 1997) donde las características ultraestructurales de las terminales axónicas parecen estar más relacionadas con su órgano diana que con su origen. Para una más extensa discusión de este aspecto vease de la Roza y Reinoso-Suárez (2000).

### **III. Significación funcional**

Nuestros hallazgos suponen una primera contestación a una pregunta planteada por de la Roza y Reinoso-Suárez (2000) sobre la importancia de identificar en el vRPO clases individuales de neuronas respecto a sus aferentes y a sus estructuras dianas, ya que permitiría relacionar esas neuronas con una función del vRPO. La descripción de las neuronas y terminales que proyectan y provienen del RMc, nos permitirían aproximarnos a las estructuras del vRPO más estrechamente relacionadas con los mecanismos de atonía del sueño REM.

Sin embargo, en el momento de intentar buscar cualquier tipo de significación funcional de nuestros resultados morfológicos, es inevitable tener presente el estudio parcial que necesariamente hemos efectuado. En primer lugar: en la atonía que se produce durante el sueño REM no intervienen exclusivamente estos dos núcleos, aunque sean los principales responsables de la misma como ha sido desarrollado en la introducción de esta tesis. Además, el vRPO aunque es esencial para que se produzca y mantenga el sueño REM, también está implicado en otras actividades, y recibe y envía información a núcleos muy diversos del sistema nervioso central (Reinoso-Suárez y col., 1994; de la Roza y Reinoso-Suárez, 2000).

También necesariamente hemos de tener en mente la extraordinaria complejidad de las relaciones anatómicas, evidenciable especialmente cuando estudiamos éstas a un nivel ultraestructural. La regulación fina de un proceso fisiológico precisa de la información integrada desde múltiples estructuras, teniendo en cuenta además, que al hablar de estructuras o núcleos hablamos de una población heterogénea de neuronas con presumibles importantes diferencias funcionales entre ellas (en su actividad, en sus distintas conexiones, diferentes neurotransmisores, etcétera). Por ello distintos tipos de neuronas en RMc pueden estar proyectando a diferentes neuronas en vRPO.

En consecuencia, para mejorar la comprensión de los circuitos neuronales que subyacen a la atonía, presente en condiciones fisiológicas durante el sueño REM, son necesarios estudios donde se combinen: doble trazado de conexiones e inmunocitoquímica de neurotransmisores y de receptores; ésto sería completado con nuevos estudios neurofisiológicos en estos dos núcleos.

De nuestros resultados destacamos en primer lugar que el tipo de conexiones que hemos estudiado entre los dos núcleos, son recíprocas: existen neuronas en el vRPO que proyectan a RMc pero también neuronas del RMc que proyectan hacia el vRPO. Las primeras, las neuronas del vRPO que proyectan a RMc, tienen diferentes formas y tamaños y posiblemente con diferencias bioquímicas y funcionales importantes. De ellas depende en gran parte la actividad del RMc y, por consiguiente, el tono muscular durante el sueño REM. A su vez el RMc está modulando el vRPO, lo que nos permite pensar en una relación recíproca para una correcta organización de la atonía en el sueño REM. Pero además el RMc proyecta abundantemente al vRPO. Esta proyección del RMc al vRPO puede ser la base morfológica de la importancia que algunos autores atribuyen al RMc en la génesis del sueño REM: Vanni-Mercier y col.,



(1991), señalan que tras una transección en un nivel prebulbar o pontino caudal, el puente aislado parece ser insuficiente para generar el sueño REM.

Las conexiones entre vRPO y RMc parecen ser en parte glutamatérgicas, ya que en el vRPO se han descrito neuronas de esta naturaleza que proyectan a RMc (Lai y col., 1999) y la estimulación con glutamato del RMc induce atonía (Lai y Siegel, 1988), habiéndose demostrado igualmente un aumento de la liberación de glutamato en bulbo rostromedial durante el sueño REM (Kodama y col., 1998).

Anteriormente hemos discutido el significado de que neuronas de proyección a RMc reciban a su vez terminales marcadas y de la compleja organización de estas terminales. El hecho de que esta circunstancia sólo haya sido encontrada en cuatro de las 17 neuronas estudiadas ultraestructuralmente puede indicar que no todas las neuronas que proyectan a RMc están recibiendo este tipo de regulación, lo que nos hace pensar de nuevo en la diversidad y complejidad de las relaciones entre vRPO y RMc. Es verdad, que debemos tener en cuenta, que en ninguno de nuestros casos hemos inyectado todo el RMc y que en consecuencia las neuronas que reciben proyecciones directas de este núcleo pueden encontrarse en mayor número de las aquí descritas.

Los diferentes tipos de terminales que reciben las neuronas del vRPO que proyectan a RMc deben de tener diferentes orígenes. Una descripción detallada del tipo de terminales que reciben las neuronas del vRPO y de los posibles orígenes y significado funcional de las mismas la encontramos en el trabajo de De la Roza y Reinoso-Suárez (2000). Las diferencias en la organización sináptica de las distintas neuronas marcadas retrógradamente aquí descritas sugieren igualmente diferencias funcionales.

En lo que respecta a la atonía que se registra en el electromiograma durante el sueño REM recordemos que existen también conexiones directas desde vRPO hasta médula espinal (Matsuyama y col., 1997 y 1999), sin embargo, la regulación del tono por parte de estos haces retículoespinales parece ser más específica (de la Roza y Reinoso-Suárez, 2000), y no ser precisamente la que se produce durante el sueño REM, que parece depender principalmente de las conexiones desde vRPO hacia el RMc.

Podemos resumir: que neuronas de diferentes características morfológicas, situadas principalmente en la la parte caudal del mismo lado del vRPO son las que deben regular la actividad del RMc para que se produzca la atonía del sueño REM. Que algunas de estas neuronas, además de la información que reciben de otras muchas estructuras, están moduladas por la información procedente del RMc. Que el

RMc modula la actividad de neuronas situadas en prácticamente toda la extensión del vRPO. Igualmente, debemos insistir en la complejidad de estas conexiones de las que aún no conocemos sus posibles neurotransmisores. Todo ello nos hace pensar, una vez más, en el difícil y delicado equilibrio que tiene que existir entre las numerosas aferentes al vRPO y las conexiones de éste con sus estructuras diana para que se puedan producir armónicamente, y a su tiempo, todas las manifestaciones que caracterizan el sueño REM.

**VI.**

# **Conclusiones**



## CONCLUSIONES

El objetivo fundamental de la elaboración de esta tesis fue el estudio ultraestructural de las conexiones establecidas por la porción ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO), como responsable de la génesis y mantenimiento del sueño REM, con el núcleo reticular magnocelular del bulbo raquídeo (RMc), responsable principal de la atonía que se produce durante esta fase del ciclo vigilia-sueño. En este trabajo se han utilizado técnicas de trazado de vías nerviosas en gatos, mediante la inyección en RMc de trazadores que son transportados retrógrada y anterógradamente, y el material fue estudiado en el microscopio electrónico.

Tras un análisis crítico y discusión de los resultados de nuestros experimentos podemos establecer las siguientes conclusiones:

- 1) Las neuronas del vRPO que proyectan al RMc constituyen una población muy heterogénea que incluye tanto neuronas multipolares de mediano tamaño como neuronas bipolares pequeñas. Estas neuronas de proyección al RMc no parecen presentar características morfológicas específicas dentro de la población general del vRPO.
- 2) La forma y el tamaño de las neuronas que proyectan al RMc parecen estar relacionadas, no solamente con el número de terminales nerviosas que reciben, sino también con la frecuencia de las mismas. La diferencia observada entre las frecuencias sinápticas de las neuronas del vRPO, multipolares medianas y bipolares pequeñas, podría explicar distintas propiedades electrofisiológicas de sus membranas. En el soma de las neuronas multipolares parece integrarse una mayor cantidad de información que en las bipolares pequeñas del vRPO.
- 3) Algunas de las neuronas que proyectan al RMc, cuyas características morfológicas y frecuencias sinápticas son similares, presentan diferencias respecto a la proporción de los distintos tipos de terminales sinápticas que reciben. Esto podría explicar la existencia de subgrupos celulares con funciones específicas.
- 4) Las neuronas del vRPO, que proyectan al RMc y tienen terminales marcadas sobre el soma o las dendritas, reciben aferencias desde este mismo núcleo. Es decir, el RMc regula la actividad de algunas de las neuronas del vRPO que proyectan al mismo, a través de un circuito de retroalimentación. Sin embargo, algunas de las terminales

marcadas podrían pertenecer a axones colaterales de neuronas del vRPO que proyectan al RMc.

- 5) La proyección desde el RMc es divergente, ya que modula la actividad de un grupo heterogéneo de neuronas localizadas en toda la extensión del vRPO. Además, dicha proyección se distribuye por toda la superficie neuronal, desde el soma hasta las dendritas distales.
- 6) Aunque la mayoría de las terminales procedentes del RMc establece sinapsis asimétricas (posiblemente excitatorias) sobre las neuronas del vRPO, algunas terminales marcadas forman sinapsis simétricas (probablemente inhibitorias) indicando la existencia de vías distintas desde el RMc hacia el vRPO. Pero algunas de las sinapsis simétricas también podrían corresponder a los axones colaterales de neuronas del vRPO que proyectan al RMc.
- 7) La alta variabilidad observada en las características ultraestructurales de las terminales procedentes del RMc es similar a la observada en las terminales de origen diverso localizadas sobre las neuronas del vRPO que proyectan al RMc.
- 8) Las características ultraestructurales de ambos tipos de terminales (procedentes del RMc o localizadas sobre las neuronas que proyectan al RMc) sobre las dendritas muestran diferencias significativas en relación con su localización proximal-distal.

La diversidad y complicación de las conexiones entre el vRPO y el RMc, aquí descritas, contribuyen a demostrar la gran complejidad de los mecanismos que intervienen en una de las manifestaciones del sueño REM: la atonía. Este hecho permite hipotetizar sobre la mayor complejidad de los mecanismos necesarios para que el vRPO organice armónica y simultáneamente todas las manifestaciones comportamentales y bioeléctricas que definen el sueño REM que tradicionalmente se han simplificado considerablemente.

**VII.**

## **Bibliografía**



## BIBLIOGRAFÍA

- Aicher, S.A., Donald, J.R., Nicolae, R. and Milner, T.A. 1995. Monosynaptic projections from the medullary gigantocellular reticular formation to sympathetic preganglionic neurons in the thoracic spinal cord. *J. Comp. Neurol.*,363: 563-580
- Anderson, J.C., Binzegger, T., Martin, K.A.C. and Rockland, K.S. 1998. The connection from cortical area V1 to V5: a light and electron microscopic study. *J. Neurosci.*,18: 10525-10540
- Anderson, M. and Salmon, M.V. 1977. Symptomatic cataplexy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*,40: 186-191
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V. and Haydon, P.G. 1999. Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*,77: 699-706
- Aserinsky, E. and Kleitman, N. 1953. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science*,118: 27-28
- Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. 1984. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res.*,306: 39-52
- Baghdoyan, H.A., Rodrigo-Angulo, M.L., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. 1987. A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res.*,414: 245-261
- Baghdoyan, H.A., Spotts, J.L. and Snyder, S.G. 1993. Simultaneous pontine and basal forebrain microinjections of carbachol suppress REM sleep. *J. Neurosci.*,13: 229-242
- Barros-Ferreira, M., Chodkiewicz, J., Lairy, G.C. and Salzarulo, P. 1975. Disorganized relations of tonic and phasic events of REM sleep in a case of brain stem tumour. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*,38: 203-207
- Batini, C., Magni, F., Paletini, M., Rossi, G.F. and Zanchetti, A. 1959. Neural mechanisms underlying the enduring EEG and behavioral activation in the midpontine pretrigeminal cat. *Arch. Ital. Biol.*,97: 13-25
- Berger, H. 1929. Über das elektrenkephalogramm des Menschen. *Arch. Psychiat.*,87: 527-536
- Bevan, M.D., Clarke, N.P. and Bolam, J.P. 1997. Synaptic integration of functionally diverse pallidal information in the entopeduncular nucleus and subthalamic nucleus in the rat. *J. Neurosci.*,17: 308-324
- Bier, M.J. and McCarley, R.W. 1994. REM-enhancing effects of the adrenergic antagonist idazoxan infused into the medial pontine reticular formation of the freely moving cat. *Brain Res.*,634: 333-338
- Bodian, D. 1946. Spinal projections of brainstem in rhesus monkey, deduced from retrograde chromatolysis. *Anat. Rec.*, 94: 512
- Bowsher, D. and Westman, J. 1970. The gigantocellular reticular region and its spinal afferents: a light and electron microscope study in the cat. *J. Anat.*,106: 23-36
- Braun, A.R., Balkin, T.J., Wesenten, N.J., Carson, R.E., Varga, M., Baldwin, P., Selbie, S., Belenky, G. and Herscovitch, P. 1997. Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H<sub>2</sub>(15)O PET study. *Brain*,120: 1173-1197
- Bremer, F. 1935. Cerveau isolé et physiologie du sommeil. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*,118: 1235-1241

- Bremer, F. 1936. Nouvelles recherches sur le mécanisme du sommeil. C. R. Seances Soc. Biol. Fil. (Paris),122: 460-464
- Brillat-Savarin, A. 1841. Physiologie du goût ou méditations de gastronomie transcendente. Paris, Lavigne, Libraire Editeur.
- Brodin, L., Löw, P. and Shupliakov, O. 2000. Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. Curr. Opin. Neurobiol.,10:312-320
- Brushart, T.M. and Mesulam, M.M. 1980. Transganglionic demonstration of central sensory projections from skin and muscle with HRP-lectin conjugates. Neurosci. Lett.,17: 1-6
- Budd, S.L. and Nicholls, D.G. 1996. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. J. Neurochem.,66: 403-411
- Camacho-Evangelista, A. and Reinoso-Suárez, F. 1964. Activating and synchronizing centers in cat brain. Science,146: 268-270
- Carli, G. and Zanchetti, A. 1965. A study of pontine lesions supressing deep sleep in the cat. Arch. Ital. Biol.,103: 751-788
- Carson, K.A. and Mesulam, M.M. 1982. Electron microscopic tracing of neural connections with horseradish peroxidase. In M.M. Mesulam (ed) Tracing neural connections with horseradish peroxidase. IBRO Handbook Series. Wiley-Interscience, Chichester: 153-184
- Cook, E.P. and Johnston, D. 1997. Active dendrites reduce location-dependent variability of synaptic input trains. J. Neurophysiol.,78: 2116-2128
- Cordeau, J.P. and Mancía, M. 1959. Evidence for the existence of an electroencephalographic synchronization mechanism originating in the lower brain stem. Electroenceph. Clin. Neurophysiol.,11: 551-564
- Cremona, O. and De Camilli, P. 1997. Synaptic vesicle endocytosis. Curr. Opin. Neurobiol.,7: 323-330
- Cummings, J.L. and Greenberg, R. 1977. Sleep patterns in the "locked-in" syndrome. Electroenceph. Clin. Neurophysiol.,43: 270-271
- Czeisler, C.A. and Richardson, G.S. 1998. Trastornos del sueño y de los ritmos circadianos. En Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L. and Longo, D.L. (eds) Harrison, Principios de Medicina Interna, 14ª edición. McGraw-Hill, Madrid: 172-182
- Chase, M.H. and Morales, F.R. 1983. Subthreshold excitatory activity and motoneuron discharge during REM periods of active sleep. Science,221: 1195-1198
- Chase, M.H., Morales, F.R., Boxer, P.A., Fung, S.J. and Soja, P.J. 1986. Effect of stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis on the membrane potential of cat lumbar motoneurons during sleep and wakefulness. Brain Res.,386: 237-244
- Chase, T.N., Moretti, L. and Pinsky, A.L. 1968. Clinical and electroencephalographic manifestations of vascular lesions of the pons. Neurology,18: 357-368
- Chicurel, M.E. and Harris, K.M. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. J. Comp. Neurol.,325: 169-182
- De Andrés, I., Gómez-Montoya, J., Gutiérrez-Rivas, E. and Reinoso-Suárez, F. 1985. Differential action upon sleep states of ventrolateral and central areas of pontine tegmentum field. Arch. Ital. Biol.,123: 1-11

- De la Roza, C. y Reinoso-Suárez, F. 1997. Análisis cuantitativo de las terminales nerviosas localizadas en la parte ventral del núcleo reticular oral del puente. *Rev. Neurol.*,25: 1805
- De la Roza, C. and Reinoso-Suárez, F. 1998. Morphology and frequency of axon terminals on the somata and dendrites of neurons in the ventral oral pontine reticular nucleus. *Eu. J. Neurosci.* 10, Suppl. 10: 32
- De la Roza, C. and Reinoso-Suárez, F. 2000. Ultrastructural synaptic organization of axon terminals in the ventral part of the cat oral pontine reticular nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 427: 31-53
- De Robertis, E. 1955. Submicroscopic organization of some synaptic regions. *Acta Neurol. Latinoamer.*,1: 3-15
- Delashaw, J.B., Foutz, A.S., Guilleminault, T.C. and Dement, W.C. 1979a. Cholinergic mechanisms and cataplexy in dogs. *Exp. Neurol.*,66: 745-757
- Delashaw, J.Jr., Foutz, A.S., Guilleminault, C. and Dement, W.C. 1979b. Effects of pharmacological alterations of acetylcholine on cataplexy in dogs. *Sleep Res.*, 8: 180
- Dement, W. 1958. The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*,10: 291-296
- Dement, W.C., Carskadon, M.A. and Guilleminault, C. 1976. Narcolepsy. diagnosis and treatment. *Primary Care*,3: 609-623
- Dement, W.C. and Kleitman, N. 1957. The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J. Exp. Psychol.*,53: 339-346
- Dempsey, E.W. and Morison, R.S. 1942. The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. *Amer. J. Physiol.*,135: 293-300
- Destombes, J., Horscholle-Bossavit, G., Thiesson, D. and Jami, L. 1992. Alpha and gamma motoneurons in the peroneal nuclei of the cat spinal cord: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.*,317: 79-90
- Elazar, Z. and Paz, M. 1990. Catalepsy induced by carbachol microinjected into the pontine reticular formation of rats. *Neurosci. Lett.*,115: 226-230
- Feldman, M.H. 1971. Physiological observations in a chronic case of "locked-in" syndrome. *Neurology*,21: 459-478
- Fields, R.D. and Stevens, B. 2000. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *TINS*,23: 625-633
- Foutz, A.S., Delashaw, J.B.Jr., Guilleminault, C. and Dement, W.C. 1981. Monoaminergic mechanisms and experimental cataplexy. *Ann. Neurol.*,10: 369-376
- Frederickson, C.J. and Hobson, J.A. 1970. Electrical stimulation of the brain stem and subsequent sleep. *Arch. Ital. Biol.*,108: 564-576
- Freund, T.F., Martin, K.A.C., Soltesz, I., Somogyi, P. and Whitteridge, D. 1989. Arborisation pattern and postsynaptic targets of physiologically identified thalamocortical afferents in striate cortex of the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.*,289: 315-336
- Friedlander, M.J., Martin, K.A.C. and Wassenhove-McCarthy, D. 1991. Effects of monocular visual deprivation on the innervation of cortical area 18 in the cat by individual thalamocortical axons. *J. Neurosci.*,11: 3268-3288
- Fung, S.J., Boxer, P.A., Morales, F.R. and Chase, M.H. 1982. Hyperpolarizing membrane response induced in lumbar motoneurons by stimulation of the nucleus reticularis pontis oralis during active sleep. *Brain Res.*,248: 267-273



- Gad, H., Ringstad, N., Löw, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenck, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crum, J., Ellisman, M.H., De Camilli, P., Shupliakov, O. and Brodin, L. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron*,27: 301-312
- Garzón, M., De Andrés, I. and Reinoso-Suárez, F. 1996. Sleep patterning after cholinergic and glutamatergic stimulation in the ventral oral pontine tegmentum. *J. Sleep Res.*,5: 72
- Garzón, M., De Andrés, I. and Reinoso-Suárez, F. 1997. Neocortical and hippocampal electrical activities are similar in spontaneous and cholinergic-induced REM sleep. *Brain Res.*,766: 266-270
- Garzón, M., De Andrés, I. and Reinoso-Suárez, F. 1998. Sleep patterns after carbachol delivery in the ventral oral pontine tegmentum of the cat. *Neurosci.*,83: 1137-1144
- George, M., Haslett, W. and Jenden, D. 1964. A cholinergic mechanism in the brain-stem reticular formation: induction of paradoxical sleep. *Int. J. Neuropharmacol.*,3: 541-552
- Gerfen, C.R., O'Leary, D.D.M. and Cowan, W.M. 1982. A note on the transneuronal transport of wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase in the avian and rodent visual systems. *Exp. Brain Res.*,48: 443-448
- Gibbins, I.L., Rodgers, H.F., Matthew, S.E. and Murphy, S.M. 1998. Synaptic organization of lumbar sympathetic ganglia of guinea pigs: serial section ultrastructural analysis of dye-filled sympathetic final motor neurons. *J. Comp. Neurol.*,402: 285-302
- Goessens, G. 1984. Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.*,87: 107-157
- Gutiérrez-Rivas, E., De Andrés, I., Gómez-Montoya, J. and Reinoso-Suárez, F. 1978. The influence of rostromedial ventrolateral region on the sleep wakefulness cycle. *Experientia*,34: 61-62
- Hamori, J., Pasik, P. and Pasik, T. 1975. Postnatal differentiation of "presynaptic dendrites" in the lateral geniculate nucleus of the rhesus monkey. *Adv. Neurol.*,12: 149-161
- Hanley, J.J. and Bolam, J.P. 1997. Synaptology of the nigrostriatal projection in relation to the compartmental organization of the neostriatum in the rat. *Neurosci.*,81: 353-370
- Hayes, R.L., Pechura, C.M., Katayama, Y., Povlishock, J.T., Giebel, M.L. and Becker, D.P. 1984. Activation of pontine cholinergic sites implicated in unconsciousness following cerebral concussion in the cat. *Science*,223: 301-303
- Hendricks, J.C., Morrison, A.R. and Mann, G.L. 1982. Different behaviours during paradoxical sleep without atonia depend on pontine lesion site. *Brain Res.*,239: 81-105
- Hernández-Peón, R. and Drucker-Colin, R.A. 1970. A neuronographic study of corticobulbar hypnogenic pathways. *Physiol. Behav.*,5: 721-725
- Hess, W.R. 1954. The diencephalic sleep center. In E.D. Adrian, F. Bremer and H.H. Jasper (eds) *Brain mechanisms and consciousness*. Blackwell, Oxford: 117-136
- Heuser, J. 1989. The role of coated vesicles in recycling of synaptic vesicle membrane. *Cell Biol. Int. Rep.*,13: 1063-1076
- Hillman, H. and Deutsch, K. 1978. Area changes in slices of rat brain during preparation for histology or electron microscopy. *J. Microsc.*,114: 78-84
- Hishikawa, Y., Sumitsuji, N., Matsumoto, K. and Kaneko, Z. 1965. H-reflex and EMG of the mental and hyoid muscles during sleep, with special reference to narcolepsy. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*,18: 487-492

- Hobson, J.A., Lydic, R. and Baghdoyan, H.A. 1986. Evolving concepts of sleep cycle generation: from brain centers to neuronal populations. *The behavioral and brain sciences*,9: 371-448
- Horner, R.L. and Kubin, L. 1999. Pontine carbachol elicits multiple rapid eye movement sleep-like neural events in urethane-anaesthetized rats. *Neuroscience*,93: 215-226
- Ilinsky, I.A. and Kultas-Ilinsky, K. 1990. Fine structure of the magnocellular subdivision of the ventral anterior thalamic nucleus (Vame) of *Macaca mulatta*: I. Cell types and synaptology. *J. Comp. Neurol.*,294: 455-478
- Ilinsky, I.A., Yi, H. and Kultas-Ilinsky, K. 1997. Mode of termination of pallidal afferents to the thalamus: a light and electron microscopic study with anterograde tracers and immunocytochemistry in *macaca mulatta*. *J. Comp. Neurol.*,386: 601-612
- Ingham, C.A., Bolam, J.P., Wainer, B.H. and Smith, A.D. 1985. A correlated light and electron microscopic study of identified cholinergic basal forebrain neurons that project to the cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.*,239: 176-192
- Itaya, S.K. and Van Hoesen, G.W. 1982. WGA-HRP as a transneuronal marker in the visual pathways of monkey and rat. *Brain Res.*,236: 199-204
- Iwakiri, H., Matsuyama, K. and Mori, S. 1993. Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: A microdialysis study. *Neuroscience Res.*,18: 157-170
- Jankowska, E., Lund, S., Lundberg, A. and Pompeiano, O. 1968. Inhibitory effects evoked through ventral reticulospinal pathways. *Arch. Ital. Biol.*,106: 124-140
- Jones, B.E. 1979. Elimination of paradoxical sleep by lesions of the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Neurosci. Lett.*,13: 285-293
- Jones, B.E. 1990. Influence of the brainstem reticular formation, including intrinsic monoaminergic and cholinergic neurons, on forebrain mechanisms of sleep and waking. In: Mancina, M. and Marini, G (eds) *The diencephalon and sleep*. New York: Raven Press, 31-48
- Jones, B.E., Harper, S.T. and Halaris, A.E. 1977. Effects of locus coeruleus lesions upon cerebral monoamine content, sleep-wakefulness states and the responses to amphetamine in the cat. *Brain Res.*,124: 473-496
- Jones, E.G. and Powell, T.P.S. 1969. The cortical projection of the ventroposterior nucleus of the thalamus in the cat. *Brain Res.*,13: 298-318
- Jouvet, M. 1962. Recherches sur les structures nerveuses et les mecanismes responsables des differentes phases du sommeil physiologique. *Arch. Ital. Biol.*,100: 125-206
- Jouvet, M. 1972. The role of monoamine and acetylcholine containing neurones in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergebn. Physiol.*,64: 166-307
- Jouvet, M. 1979. What does a cat dream about. *Trends Neurosci.*,2: 15-16
- Jouvet, M. et Delorme, F. 1965. Locus coeruleus et sommeil paradoxal. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil. (Paris)*,159: 895-899
- Jouvet, M. et Michel, F. 1959. Correlations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique. *C. R. Soc.Biol.*,153: 422-425
- Jouvet, M., Michel, F. et Courjon, J. 1959. Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique. *C. R. Seances Soc. Biol.*,CLIII: 1024-1028

- Jouvet, D., Vimont, P., Delorme, F. and Jouvet, M. 1964. Étude de la privation sélective de la phase paradoxal de sommeil chez le chat. *C. R. Soc. Biol.*,158: 756-759
- Katayama, Y., De Witt, D.S., Becker, D.P. and Hayes, R. 1984. Behavioral evidence for a cholinceptive pontine inhibitory area: descending control of spinal motor output and sensory input. *Brain Res.*,296: 241-262
- Keifer, J. and Lustig, D.G. 2000. Comparison of cortically and subcortically controlled motor systems. II. Distribution of anterogradely labeled terminal boutons on intracellularly filled rubrospinal neurons in rat and turtle. *J. Comp. Neurol.*,416: 101-111
- Kelly, D.D. 1991. Sleep and dreaming. In Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M. (eds). *Principles of neural science*, third edition. Elsevier, New York: 792-804
- Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G. 1982. The central cholinergic system studied by choline acetyl transferase histochemistry in the cat. *J. Comp. Neurol.*,200: 151-201
- Kodama, T., Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. 1998. Enhanced glutamate release during REM sleep in the rostromedial medulla as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.*,780: 178-181
- Korogod, S.M., Kulagina, I.B., Horscholle-Bossavit, G., Gogan, P. and Tyc-Dumont, S. 2000. Activity-dependent reconfiguration of the effective dendritic field of motoneurons. *J. Comp. Neurol.*,422: 18-34
- Kristensson, K. and Olsson, Y. 1971. Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res.*,29: 363-365
- Kshatri, A.M., Baghdoyan, H.A. and Lydic, R. 1998. Cholinomimetics, but not morphine, increase antinociceptive behavior from pontine reticular regions regulating rapid-eye-movement sleep. *Sleep*,21: 677-685
- Kultas-Ilinsky, K., Reising, L., Yi, H. and Ilinsky, I.A. 1997. Pallidal afferent territory of the *Macaca mulatta* thalamus: neuronal and synaptic organization of the Vadc. *J. Comp. Neurol.*,386: 573-600
- Lafarga, M., Andres, M.A., Berciano, M.T. and Maquiera, E. 1991. Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat. *J. Comp. Neurol.*,308: 329-339
- Lai, Y.Y., Clements, J.R., Wu, X.Y., Shalita, T., Wu, J.P., Kuo, J.S. and Siegel, J.M. 1999. Brainstem projections to the ventromedial medulla in cat: retrograde transport horseradish peroxidase and immunohistochemical studies. *J. Comp. Neurol.*,408: 419-436
- Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. 1988. Medullary regions mediating atonia. *J. Neurosci.*,8: 4790-4796
- Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. 1990. Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation. *J. Neurosci.*,10: 2727-2734
- Leonard, T.O. and Lydic, R. 1997. Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation and respiratory rate. *J. Neurosci.*,17: 774-785
- Lim, C., Blume, H.W., Madsen, J.R. and Saper, C.B. 1997. Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. *J. Comp. Neurol.*,385: 325-351
- Lindsley, D.B., Bowden, H.W. and Magoun, H.W. 1949. Effect upon the EEG of acute injury to the brain stem activating system. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*,1: 475-486
- Lombard, W.P. 1888. *Am. J. Psychol.*,1: 1 (Citado por Parkes, 1985)



- Luppi, P.H., Sakai, K., Fort, P., Salvert, D. and Jouvet, M. 1988. The nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic and cholinergic afferents to the cat nucleus reticularis magnocellularis: a double labeling study with cholera toxin as a retrograde tracer. *J. Comp. Neurol.*, 277: 1-20
- Llinas, R. and Terzuolo, C.A. 1964. Mechanismes of supraspinal actions upon spinal cord activities. Reticular inhibitory mechanisms on alpha-extensor motoneurons. *J. Neurophysiol.*, 27: 579-591
- Llinas, R. and Terzuolo, C.A. 1965. Mechanismes of supraspinal actions upon spinal cord activities. Reticular inhibitory mechanisms upon flexor motoneurons. *J. Neurophysiol.*, 28: 413-422
- Macnish, R. 1830. The philosophy of sleep. E. Mc Phun, Glasgow. (Citado por Parkes, 1985)
- Madoz, P. and Reinoso-Suárez, F. 1968. Influence of lesions in preoptic region on the states of sleep and wakefulness. *Proc. XXIV Int. Cong. Physiol. Sci.*, 7: 276
- Magee, J.C. and Cook, E.P. 2000. Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons. *Nature Neurosci.*, 3: 895-903
- Magoun, H.W. 1944. Bulbar inhibition and facilitation of motor activity. *Science*, 100: 549-550
- Magoun, H.W. and Rhines, R. 1946. An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation. *J. Neurophysiol.*, 9: 165-171
- Mainen, Z.F. and Sejnowski, T.J. 1996. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature*, 382: 363-366
- Marchesi, G.F. and Strata, P. 1970. Climbing fibers of rat cerebellum: modulation of activity during sleep. *Brain Res.*, 17: 145-148
- Matsuyama, K. and Drew, T. 1997. Organization of the projections from the pericruciate cortex to the pontomedullary brainstem of the cat: a study using the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.*, 389: 617-641
- Matsuyama, K., Kobayashi, Y., Takakusaki, K., Mori, S. and Kimura, H. 1993. Termination mode and branching patterns of reticuloreticular and reticulospinal fibers of the nucleus reticularis pontis oralis in the cat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci. Res.*, 17: 9-21
- Matsuyama, K., Mori, F., Kuze, B. and Mori, S. 1999. Morphology of single pontine reticulospinal axons in the lumbar enlargement of the cat: a study using the anterograde tracer PHA-L. *J. Comp. Neurol.*, 410: 413-430
- Matsuyama, K., Takakusaki, K., Nakajima, K. and Mori, S. 1997. Multi-segmental innervation of single pontine reticulospinal axons in the cervico-thoracic region of the cat: anterograde PHA-L tracing study. *J. Comp. Neurol.*, 377: 234-250
- McCulloch, W.S., Graf, C. and Magoun, H.W. 1946. A cortico-bulbo-reticular pathway from area 4s. *J. Neurophysiol.*, 9: 127-132
- Meessen, H. and Olszewski, J. 1949. A cytoarchitectonic atlas of the rhombencephalon of the rabbit. Karger, Basel and New York.
- Mesulam, M.M. 1978. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-cardiogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 106-117

- Mesulam, M.M. 1982. Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways. Axonal transport enzyme histochemistry and their applications for tracing neural pathways - Axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In M.M. Mesulam (ed) Tracing neural connections with horseradish peroxidase. IBRO Handbook Series. Wiley-Interscience, Chichester: 1-151
- Mesulam, M.M. and Rosene, D.L. 1979. Sensitivity in horseradish peroxidase neurohistochemistry: a comparative and quantitative analysis of nine methods. *J.Histochem. Cytochem.*,27: 763-773
- Milner, T.A. and Pickel, V.M. 1986. Ultrastructural localization and afferent sources of substance P in the rat parabrachial region. *Neurosci.*,17: 687-707
- Mitler, M.M. and Dement, W.C. 1974. Cataplectic-like behavior in cats after microinjections of carbachol in pontine reticular formation. *Brain Res.*,68: 335-343
- Morales, F.R., Engelhardt, J.K., Soja, P.J., Pereda, A.E. and Chase, M.H. 1987. Motoneuron properties during motor inhibition produced by microinjection of carbachol into the pontine reticular formation of the decerebrate cat. *J. Neurophysiol.*,57: 1118-1129
- Mori, S. 1987. Integration of posture locomotion in acute decerebrate cats and in awake, freely moving cats. *Prog. Neurobiol.*,28: 161-195
- Mori, S., Matsuyama, K., Kohyama, J., Kobayashi, Y. and Takakusaki, K. 1992. Neuronal constituents of postural and locomotor control systems and their interactions in cats. *Brain Dev. Suppl.*,14: 109-120
- Morison, R.S., Finley, K.H. and Lothrop, G.N. 1943. Influence of basal forebrain areas on the electrocorticogram. *Amer. J. Physiol.*,139: 410-416
- Morrison, A.R. 1988. Paradoxical sleep without atonia. *Arch. Ital. Biol.*,126: 275-289
- Moruzzi, G. and Magoun, H.W. 1949. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*,1: 455-473
- Murphy, J.P. and Gellhorn, E. 1945. The influence of hypothalamic stimulation on cortically induced movements and on action potentials of the cortex. *J. Neurophysiol.*,8: 341-364
- Nauta, W.J.H. 1946. Hypothalamic regulation of sleep in rats. *J. Neurophysiol.*,9: 285-316
- Nitz, D., Andersen, A., Fahringer, H., Nienhuis, R., Mignot, E. and Siegel, J. 1995. Altered distribution of cholinergic cells in the narcoleptic dog. *Neuroreport*,6: 1521-1524
- Núñez, Á., Buño, W. and Reinoso-Suárez, F. 1998. Neurotransmitter actions on oral pontine tegmental neurons of the rat: an in vitro study. *Brain Res.*,804: 144-148
- Núñez, Á., De la Roza, C., Rodrigo-Angulo, M.L., Buño, W. and Reinoso-Suárez, F. 1997. Electrophysiological properties and cholinergic responses of rat ventral oral pontine reticular neurons in vivo. *Brain Res.*,754: 1-11
- Ohara, P.T. and Lieberman, A.R. 1993. Some aspects of the synaptic circuitry underlying inhibition in the ventrobasal thalamus. *J. Neurocytol.*,22: 815-825
- Ohara, P.T., Sefton, A.J. and Lieberman, A.R. 1980. Mode of termination of afferents from the thalamic reticular nucleus in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat. *Brain Res.*,197: 503-506
- Olszewski, J. and Baxter, D. 1954. Cytoarchitecture of the human brain stem. New York and Basel, Karger.

- Örnung, G. and Ulfhake, B. 1990. Changes in size and shape during histochemical preparation for light and electron microscopy of neurons intracellularly labelled with horseradish peroxidase. *Acta Physiol. Scand.*,140: 501-506
- Papez, J.W. 1926. Reticulo-spinal tracts in the cat. *J. Comp. Neurol.*,41: 365-399
- Parent, A. 1996. Carpenter's human neuroanatomy. P. Coryell (ed). Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Parkes, J.D. 1985. Sleep and its disorders. W.B. Saunders Company, London.
- Peng, Y-Y. 1998. Effects of mitochondrion on calcium transients at intact presynaptic terminals depend on frequency nerve firing. *Am. Physiol. Soc.*, 186-195
- Peters, A., Palay, S.L. and Webster, H. de F. 1976. The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Saunders, Philadelphia.
- Peters, A., Palay, S.L. and Webster, H. de F. 1991. The fine structure of the nervous system. 3rd edition. Oxford University Press, New York.
- Pierce, J.P. and Lewin, G.R. 1994. An ultrastructural size principle. *Neurosci.*,58: 441-446
- Pierce, J.P. and Mendell, L.M. 1993. Quantitative ultrastructure of Ia boutons in the ventral horn: scaling and positional relationships. *J. Neurosci.*,13: 4748-4763
- Piéron, H.. 1913. Le problème physiologique du sommeil. Masson et Cie, Paris: 3
- Pitts, R.F. 1940. The respiratory center and its descending pathways. *J. Comp. Neurol.*,72: 605-625
- Pompeiano, O. 1972. Reticular control of the vestibular nuclei: physiology and pharmacology. *Prog. Brain Res.*,37: 601-618
- Pompeiano, O. 1975. The control of posture and movements during REM sleep: neurophysiological and neurochemical mechanisms. *Acta Astronautica*,2: 225-239
- Priestley, J.V. 1984 Pre-embedding ultrastructural immunocytochemistry: immunoenzyme techniques. In J.M. Polak and I.M. Varndell (eds.) *Immunolabeling for Electron Microscopy*. Elsevier, Amsterdam: 37-52
- Purves, D., Voyvodic, J.T., Magrassi, L. and Yawo, H. 1987. *Science*,238: 1122-1126
- Quattrochi, J.J., Mamelak, A.N., Madison, R.D., Macklis, J.D. and Hobson, J.A. 1989. Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorescent microspheres. *Science*,245: 984-986
- Rajakumar, N., Elisevich, K. and Flumerfelt, B.A. 1993. Biotinylated dextran: a versatile anterograde and retrograde neuronal tracer. *Brain Res.*,607: 47-53
- Ralston, D.D. 1994a. Corticorubral synaptic organization in *Macaca fascicularis*: a study utilizing degeneration, anterograde transport of WGA-HRP, and combined immuno-GABA-gold technique and computer-assisted reconstruction. *J. Comp. Neurol.*,350: 657-673
- Ralston, D.D. 1994b. Cerebellar terminations in the red nucleus of *Macaca fascicularis*: an electron-microscopic study utilizing the anterograde transport of WGA-HRP. *Somatosens. Motor Res.*,11: 101-107
- Ramón y Cajal, S. 1904. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. N. Moya, Madrid.



- Ramón y Cajal, S. 1909. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. A.Maloine, Paris. Segunda reimpresión, 1972, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal, Madrid.
- Rechtschaffen, A. and Kales, A. 1968. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Washington: Public Health Service. U.S. Government Printing Office.
- Reid, M.S., Siegel, J.M., Dement, W.C. and Mignot, E. 1994. Cholinergic mechanisms in canine narcolepsy - II. Acetylcholine release in the pontine reticular formation is enhanced during cataplexy. *Neurosci.*, 59: 523-530
- Reid, M.S., Tafti, M., Geary, J.N., Nishino, S., Siegel, J.M., Dement, W.C. and Mignot, E. 1994. Cholinergic mechanisms in canine narcolepsy - I. Modulation of cataplexy via local drug administration into the pontine reticular formation. *Neurosci.*, 59: 511-522
- Reinoso-Suárez, F. 1961. Topographischer Hirnatlas der Katze. E. Merck, A.G. Darmstad.
- Reinoso-Suárez, F. 1998. Identificación del director de la orquesta neuronal responsable del sueño paradójico. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*. Tomo CXV. Cuaderno primero.
- Reinoso-Suárez, F. and De Andrés, I. 1976. Brain structures and sleep. *Trab. Inst. Cajal Invest. Biol.*, 68: 39-68
- Reinoso-Suárez, F., De Andrés, I., Rodrigo-Angulo, M.L., De la Roza, C., Núñez, Á. and Garzón, M. 1999. The anatomy of dreaming, and REM sleep. *Eur. J. Anat.*, 3: 163-175
- Reinoso-Suárez, F., De Andrés, I., Rodrigo-Angulo, M.L. and Garzón, M. 2001. Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep. *Sleep Med. Rev.*, 5: 63-77
- Reinoso-Suárez, F., De Andrés, I., Rodrigo-Angulo, M.L. and Rodríguez-Veiga, E. 1994. Location and anatomical connections of a paradoxical sleep induction site in the cat ventral pontine tegmentum. *Eu. J. Neurosci.*, 6: 1829-1836
- Reinoso-Suárez, F., Rodrigo-Angulo, M.L., Rodríguez-Veiga, E. and De Andrés, I. 1990. Thalamic connections of the oral pontine tegmentum sites whose cholinergic stimulation produces enhancement of paradoxical sleep signs. In M. Mancia and G. Merini (eds). *The Diencephalon and Sleep*. Raven Press, New York: 49-63
- Rodrigo-Angulo, M.L., De Andrés, I. and Reinoso-Suárez, F. 1989. REM sleep generation by cholinergic microstimulation at different pontine tegmentum sites. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 15: 241
- Rodrigo-Angulo, M.L., Núñez, Á., De Andrés, I. and Reinoso-Suárez, F. 1997. Synaptic interactions of vRPO neurons with structures related to paradoxical sleep generation. *Neurosci. Abstr.*, 23: 2131
- Rosenbach, O. 1881. *Z. Klinische Med.*, 2: 17 (Citado por Parkes, 1985)
- Rossi, G.F. and Brodal, A. 1956a. Corticofugal fibers to the brain-stem reticular formation. An experimental study in the cat. *J. Anat.*, 90: 42-62
- Rossi, G.F. e Brodal, A. 1956b. Connessioni spino-reticolari nel gatto. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 32: 960-961
- Rossi, G.F. and Zanchetti, A. 1957. The brain stem reticular formation. *Anatomy and Physiology. Arch. Ital. Biol.*, 95: 199-435

- Roussel, B. 1967. Monoamines et sommeil. IV. Suppression du sommeil paradoxal et diminution de la noradrénaline cérébrale par lésions des noyaux locus coeruleus. Imprimerie des Beaux-Arts, Lyon: 141
- Roussel, B., Buguet, A., Bobillier, P. and Jouvet, M. 1967. Locus coeruleus, sommeil paradoxal, et noradrénaline cérébrale. C.R. Soc. Biol.,161: 2537-2541
- Ruda, M. and Coulter, J.D. 1982. Axonal and transneuronal transport of wheat germ agglutinin demonstrated by immunocytochemistry. Brain Res.,249: 237-246
- Sakai, K. 1980. Some anatomical and physiological properties of pontomesencephalic tegmental neurons with special reference to the PGO waves and postural atonia during paradoxical sleep. In J.A. Hobson and M.A.B. Brazier (eds). The Reticular Formation Revisited. Raven Press, New York: 427-447
- Sakai, K. 1985. Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. In D.J. McGirt, R. Drucker-Colin, A. Morrison and L. Parmeggiani (eds). Brain mechanisms of sleep. Raven Press, New York: 111-137
- Sakai, K. 1988. Executive mechanisms of paradoxical sleep. Arch. Ital. Biol.,126: 239-257
- Sakai, K., Sastre, J.P., Kanamori, N. and Jouvet, M. 1981. State-specific neurons in the pontomedullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. In O. Pompeiano and C. Ajmone-Marsan (eds). Brain mechanisms and perceptual awareness. Raven Press, New York: 405-429
- Sakai, K., Sastre, J.P., Salvert, D., Touret, M., Tohyama, M. and Jouvet, M. 1979. Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study. Brain Res.,176: 233-254
- Sato, F., Nakamura, Y. and Shinoda, Y. 1996. Three-dimensional analysis of cerebellar terminals and their postsynaptic components in the ventral lateral nucleus of the cat thalamus. J. Comp. Neurol.,371: 537-551
- Scheibel, M.E. and Scheibel, A.B. 1958. Structural substrates for integrative patterns in the brain stem reticular core. In H.H. Jasper, L.D. Proctor, R.S. Knighton, W.C. Noshay and R.T. Costello (eds). Reticular formation of the brain. Henry Ford Hospital International Symposium. Little, Brown and Company, Boston: 31-68
- Scheibel, M.E., Scheibel, A.B., Mollica, A. and Moruzzi, G. 1955. Convergence and interaction of afferent impulses on single units of reticular formation. J. Neurophysiol.,18: 309-331
- Schenk, C.H., Bundlie, S.R., Patterson, A.L. and Mahowald, M.W. 1987. Rapid eye movements sleep behavior disorder. A treatable parasomnia affecting older adults. JAMA.257: 1786-1789
- Schenkel, E. and Siegel, J.M. 1989. REM sleep without atonia after lesions of the medial medulla. Neurosci. Lett.,98: 159-165
- Schmid, S.L. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. Annu. Rev. Biochem.,66: 511-548
- Schmid, S.L., McNiven, M.A. and De Camilli, P. 1998. Dynamin and its partners: a progress report. Curr. Opin. Cell Biol.,10: 504-512
- Senba, E. and Tohyama, M. 1985. Origin and fine structure of substance P-containing nerve terminals in the facial nucleus of the rat: and immunohistochemical study. Exp. Brain Res.,57: 537-546
- Shepherd, G.M. and Koch, C. 1990. Introduction to synaptic circuits. In: Shepherd, G.M. (ed).: The synaptic organization of the brain. New York: Oxford University Press: 3-31

- Siegel, J.M., Nienhuis, R., Fahringer, H.M., Paul, R., Shiromani, P., Dement, W.C., Mignot, E. and Chiu, Ch. 1991. Neuronal activity in narcolepsy: identification of cataplexy-related cells in the medial medulla. *Science*,252: 1315-1318
- Siegel, J.M., Nienhuis, R. and Tomaszewski, K.S. 1984. REM sleep signs rostral to chronic transections at the pontomedullary junction. *Neurosci. Lett.*,45: 241-246
- Silberman, E.K., Vivaldi, E., Garfield, J., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. 1980. Carbachol triggering of desynchronized sleep phenomena: enhancement via small volume infusions. *Brain Res.*,191: 215-224
- Sotelo, C., Gotow, T. And Wassef, M. 1986. Localization of glutamic-acid-decarboxylase-immunoreactive axon terminals in the inferior olive of the rat, with special emphasis on anatomical relations between GABAergic synapses and dendro-dendritic Gap junctions. *J. Comp. Neurol.*,252: 32-50
- Spruston, N. 2000. Distant synapses raise their voices. *Nature Neurosci.*,3: 849-851
- Stahl, S.M., Layzer, R.B., Aminoff, M.J., Townsend, J.J. and Feldon, S. 1980. Continuous cataplexy in a patient with a midbrain tumour: the limp man syndrome. *Neurology*,30: 1115-1118
- Steriade, M., Jones, E.G. and McCormick, D.A. 1997. *Thalamus. Organization and function.* Oxford: Elsevier.
- Steriade, M. and McCarley, R.W. 1990. *Brainstem control of wakefulness and sleep.* New York: Plenum.
- Serman, M.B. and Clemente, C.D. 1962. Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Expl. Neurol.*,6: 91-102
- Taber, E. 1961. The cytoarchitecture of the brain stem of the cat. I. Brain stem nuclei of the cat. *J. Comp. Neurol.*,116: 27-69
- Takakusaki, K., Matsuyama, K., Kobayashi, Y., Kohyama, J. and Mori, S. 1993. Pontine microinjection of carbachol and critical zone for inducing postural atonia in reflexively standing decerebrate cats. *Neurosci. Lett.*,153: 185-188
- Tohyama, M., Sakai, K., Salvetti, D., Touret, M. and Jouvet, M. 1979. Spinal projections from the lower brain stem in the cat as demonstrated by horseradish peroxidase technique. I. Origins of the reticulospinal tracts and their funicular trajectories. *Brain Res.*,173: 383-403
- Torvik, A. and Brodal, A. 1957. The origin of reticulo-spinal fibers in the cat. An experimental study. *Anat. Rec.*,128: 113-135
- Trulsson, M.E., Jacobs, B.L. and Morrison, A.R. 1981. Raphe unit activity in normal cats and pontine lesioned cats displaying REM sleep without atonia. *Brain Res.*,226: 75-91
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S. and Barres, B.A. 2001. Control of synapse number by glia. *Science*,291: 657-661
- Ursin, R. and Serman, M.B. 1981. *A manual for standardized scoring of sleep and waking states in the adult cat.* Los Angeles: Brain Information Service / Brain Research Institute.
- Van Bockstaele, E.J., Colago, E.E.O. and Aicher, S. 1998. Light and electron microscopic evidence for topographic and monosynaptic projections from neurons in the ventral medulla to noradrenergic dendrites in the rat locus coeruleus. *Brain Res.*,784: 123-138



- Van Dongen, P.A.M., Broekkamp, D.L.E. and Cools, A.R. 1978. Atonia after carbachol microinjections near the locus coeruleus in cats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*,8: 527-532
- Van Gehuchten, A. 1903. La dégénérescence dite rétrograde. IV. Fibres réticulo-spinales ventrales. *Le Nevraxe*,5: 88-107
- Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S. and Jouvet, M. 1989. Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep. *Arch. Ital. Biol.*,127: 133-164
- Vanni-Mercier, G., Sakai, K., Lin, J.S. and Jouvet, M. 1991. Carbachol microinjections in the mediodorsal pontine tegmentum are unable to induce paradoxical sleep after caudal pontine and prebulbar transections in the cat. *Neurosci. Letters*,130: 41-45
- Veenman, C.L., Reiner, A. and Honig, M.G. 1992. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J. Neurosci. Methods*, 41: 239-254
- Von Economo, C. 1926. Die pathologie des schlafes. In A. von Bethe, G.V. Bergman, G. Embden and A. Ellinger (eds). *Handbuch der normalen und pathologischen physiologie*. Springer, Berlin Vol.17: 591-610
- Von Economo, C. 1929. Schlaftheorien. *Ergebn. Physiol.*,28: 312-339
- Weber, A.J. and Kalil, R.E. 1987. Development of corticogeniculate synapses in the cat. *J. Comp. Neurol.*,264: 171-192
- Wong-Riley, M.T.T. 1972. Neuronal and synaptic organization of the normal dorsal lateral geniculate nucleus of the squirrel monkey, *saimiri sciureus*. *J. Comp. Neurol.*,144: 25-60
- Yamamoto, K., Mamelak, A.N. Quattrochi, J.J. and Hobson, J.A. 1990. A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: locus of sensitive region. *Neurosci.*,39: 279-293
- Zarranz, J.J. and Reinoso-Suárez, F. 1971. The pontine tegmentum and sleep-wakefulness states. *Proc. XXV Int. Cong. Physiol. Sci.*,8: 618

**VIII.**

# **Abreviaturas**

## ABREVIATURAS

<b>A:</b> Núcleo ambigüo	<b>PB:</b> Tampón fosfato 0,1M, pH 7.4
<b>AO:</b> Área oval del cuerpo restiforme	<b>Per o perím:</b> Perímetro
<b>Ár:</b> Área	<b>PF:</b> Paraformaldehído
<b>Asm:</b> Asimétricas	<b>PH:</b> Núcleo praepositus del hipogloso
<b>BDA:</b> Dextrano amina biotinilado	<b>PGO:</b> Ponto-genículo-occipital
<b>BC:</b> Brachium conjunctivum	<b>PR:</b> Núcleo pálido del rafe
<b>CHR:</b> Substancia cromógena	<b>RB:</b> Cuerpo restiforme
<b>Cl2Ca:</b> Cloruro cálcico	<b>Red o redond:</b> Redondeadas
<b>Col:</b> Colaboradores	<b>RMc:</b> Núcleo reticular magnocelular del bulbo raquídeo
<b>Contralat:</b> Contralateral	<b>RGc:</b> Núcleo reticular gigantocelular
<b>CTb:</b> Subunidad B de la toxina colérica	<b>RN:</b> Núcleo rojo
<b>DAB:</b> 3,3'-Diaminobenzidina	<b>Relac:</b> Relacionadas
<b>Dcha:</b> Derecha	<b>Rod:</b> Rodeadas
<b>Dend:</b> Dendrita	<b>RPO:</b> Núcleo reticular pontino oral
<b>Desviac:</b> Desviación	<b>RPC:</b> Núcleo reticular pontino caudal
<b>Diám:</b> Diámetro	<b>SC:</b> Colículo superior
<b>Diám dend post:</b> Diámetro dendrita postsináptica	<b>Sim:</b> Simétricas
<b>Disposic:</b> Disposición	<b>Snp:</b> Sinápticas
<b>EEG:</b> Electroencefalograma	<b>SNC:</b> Sistema nervioso central
<b>EMG:</b> Electromiograma	<b>Sl:</b> Tracto solitario
<b>EOG:</b> Electrooculograma	<b>S1L:</b> Núcleo lateral del tracto solitario
<b>Estruct post:</b> Estructura postsináptica	<b>S5:</b> Tracto espinal del trigémino
<b>Fae:</b> Fibras arciformes externas	<b>T, Ter o Term:</b> Terminal
<b>GA:</b> Glutaraldehído	<b>TMB:</b> 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
<b>G7:</b> Rodilla del facial	<b>Tp:</b> Núcleo tegmentopontino
<b>H:</b> Hembra	<b>Tr:</b> Cuerpo trapezoide
<b>HRP:</b> Peroxidasa de rabanilla	<b>Tris:</b> Trizma base y Trizma hydrochloride
<b>HRP-WGA:</b> Peroxidasa de rabanilla conjugada a aglutinina de germen de trigo	<b>Variac:</b> Variación
<b>IC:</b> Colículo inferior	<b>Vesic:</b> Vesicular
<b>IO:</b> Oliva inferior	<b>vRPO:</b> Parte ventral del núcleo reticular oral del puente
<b>Ipsilat:</b> Ipsilateral	<b>VSC:</b> Tracto espinocerebeloso ventral
<b>Izq:</b> Izquierda	<b>WGA:</b> Aglutinina de germen de trigo
<b>Lap o long. aposic:</b> Longitud de aposición	<b>Zona act:</b> Zona activa
<b>LCα:</b> Locus coeruleus α	<b>5S:</b> Núcleo espinal del trigémino
<b>M:</b> Macho	<b>6N:</b> Núcleo del VI par craneal
<b>ME:</b> Microscopio electrónico	<b>8C:</b> Núcleo coclear del VIII par
<b>Memb:</b> Membrana	<b>8VM:</b> Núcleo vestibular medial del VIII par
<b>Mitoc:</b> Mitocondrial	<b>8VI:</b> Núcleo vestibular inferior del VIII par
<b>ML:</b> Lemnisco medial	<b>% ár mitoc:</b> Porcentaje de área mitocondrial
<b>MLF:</b> Fascículo longitudinal medial	<b>% term ap. term:</b> Porcentaje de terminales adyacentes a otras terminales
<b>MR:</b> Núcleo mayor del rafe	<b>% aposic o aposc:</b> Porcentaje de aposición
<b>Neur:</b> Neurona	<b>?:</b> Intermedias/indeterminadas o indicación de ignorancia o posibilidad
<b>NRL:</b> Núcleo reticular lateral	
<b>Oval:</b> Ovaladas	
<b>P:</b> Tracto piramidal	
<b>Pα:</b> Perilocus coeruleus α	
<b>PaG:</b> Substancia gris periacueductal	



**IX.**

## **Apéndice estadístico**

## APÉNDICE DEL ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO

### 3.0. Diferencias entre gatos:

I\* Terminales sobre soma y dendrita proximal de neuronas marcadas:

A. Población general de terminales:

- Área axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,04	0,02	0,1
En los grupos	476	98,69	0,21	p=0,9038
Total	478	98,74		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	137	0,63	0,42	0,04
G1191	163	0,64	0,45	0,04
G1197	179	0,65	0,49	0,04

- Perímetro axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	5,52	2,76	1,36
En los grupos	476	968,18	2,03	p=0,2583
Total	478	973,7		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	137	3,67	1,24	0,11
G1191	163	3,76	1,42	0,11
G1197	179	3,93	1,56	0,12

- Número de mitocondrias:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	11,08	5,54	0,94
En los grupos	479	2828,23	5,9	p=0,392
Total	481	2839,31		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	137	1,9	2,33	0,2
G1191	166	2,27	2,46	0,19
G1197	179	2,03	2,48	0,19

- Área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,24	0,12	6,02
En los grupos	479	9,51	0,02	p=0,0026
Total	481	9,75		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	137	0,08	0,09	0,01
G1191	166	0,13	0,15	0,01
G1197	179	0,12	0,16	0,01
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
G1155 vs. G1191	-0,05	0,03**(0,04)	5,2**	
G1155 vs. G1197	-0,05	0,03**(0,04)	4,08*	
G1191 vs. G1197	0,01	0,03	0,1	

- Porcentaje de área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test t
Entre grupos	2	3596,14	1798,07	10,29
En los grupos	476	83151,01	174,69	p=0,0001
Total	478	86747,15		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
GI155	137	10,53	10,25	0,88
GI191	163	17,35	13,79	1,08
GI197	179	15,31	14,62	1,09
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test t	
GI155 vs.GI191	-6,83	3,01***(5,07)	9,93***	
GI155 vs.GI197	-4,78	2,95**(3,88)	5,07**	
GI191 vs.GI197	2,05	2,81	1,02	

- Longitud de aposición:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test t
Entre grupos	2	1,94	0,97	2,83
En los grupos	478	163,69	0,34	p=0,0597
Total	480	165,63		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
GI155	137	1,16	0,56	0,05
GI191	166	1,13	0,56	0,04
GI197	178	1,27	0,63	0,05

- Porcentaje de aposición de la terminal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test t
Entre grupos	2	619,77	309,89	3,13
En los grupos	475	47038,92	99,03	p=0,0447
Total	477	47658,7		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
GI155	137	31,61	9,22	0,79
GI191	163	30,09	10,51	0,82
GI197	178	32,79	9,97	0,75
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test t	
GI155 vs.GI191	1,52	2,27	0,87	
GI155 vs.GI197	-1,18	2,22	0,54	
GI191 vs.GI197	-2,7	2,12*	3,12*	

B.Considerando exclusivamente las terminales que efectúan contacto sináptico en el plano de corte:

-Área axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test t
Entre grupos	2	0,58	0,29	1,33
En los grupos	112	24,45	0,22	p=0,2675
Total	114	25,03		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
GI155	36	0,64	0,44	0,07
GI191	37	0,73	0,43	0,07
GI197	42	0,81	0,52	0,08



## - Perímetro axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	9,83	4,91	2,92
En los grupos	112	188,38	1,68	p=0,058
Total	114	198,2		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	36	3,79	1,3	0,22
G1191	37	3,89	1,25	0,2
G1197	42	4,44	1,34	0,21

## - Número de mitocondrias:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	15,38	7,69	0,76
En los grupos	112	1129,72	10,09	p=0,469
Total	114	1145,1		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	36	2,17	3,01	0,5
G1191	37	2,76	3,18	0,52
G1197	42	3,05	3,31	0,51

## - Área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,23	0,11	4,92
En los grupos	112	2,59	0,02	p=0,0089
Total	114	2,82		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	36	0,07	0,09	0,01
G1191	37	0,15	0,16	0,03
G1197	42	0,18	0,18	0,03
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
G1155 vs.G1191	-0,08	0,07*	2,31	
G1155 vs.G1197	-0,11	0,07** (0,09)	4,72*	
G1191 vs.G1197	-0,03	0,07	0,37	

## - Porcentaje de área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	1854,94	927,47	6,3
En los grupos	112	16483,18	147,17	p=0,0025
Total	114	18338,13		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
G1155	36	9,57	10,01	1,67
G1191	37	17,62	13,15	2,16
G1197	42	18,67	12,83	1,98
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
G1155 vs.G1191	-8,05	5,63** (7,44)	4,02*	
G1155 vs.G1197	-9,1	5,46** (7,22)	5,46**	
G1191 vs.G1197	-1,05	5,42	0,07	

## - Longitud de aposición:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	1,73	0,86	2,65
En los grupos	112	36,57	0,33	p=0,0754

Total	114	38,3		
<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Media</b>	<b>Desviac estándar</b>	<b>Error estándar</b>
G1155	36	1,36	0,6	0,1
G1191	37	1,26	0,59	0,1
G1197	42	1,55	0,53	0,08

- Porcentaje de aposición de la terminal:

<b>Origen de la variac</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-test</b>
Entre grupos	2	311,14	155,57	2,03
En los grupos	112	8591,36	76,71	p=0,1364
Total	114	8902,51		
<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Media</b>	<b>Desviac estándar</b>	<b>Error estándar</b>
G1155	36	35,68	7,4	1,23
G1191	37	32,22	9,82	1,61
G1197	42	35,8	8,84	1,36

- Zona activa:

<b>Origen de la variac</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-test</b>
Entre grupos	2	0,01	4,30E-3	0,49
En los grupos	108	0,95	0,01	p=0,614
Total	110	0,96		
<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Media</b>	<b>Desviac estándar</b>	<b>Error estándar</b>
G1155	34	0,23	0,1	0,02
G1191	36	0,21	0,06	0,01
G1197	41	0,23	0,11	0,02

## II.\* Terminales sobre dendrita marcada: (Población general)

	Media $\pm$ S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Diám dend:</b>					
G1191	2,12 $\pm$ 1,21	0,09	242(167+77)	1,15	0,2504
G1197	1,94 $\pm$ 0,80	0,09			
<b>Área axonal:</b>					
G1191	0,71 $\pm$ 0,57	0,04	251(171+82)	1,12	0,2621
G1197	0,63 $\pm$ 0,48	0,05			
<b>Perím.axón:</b>					
G1191	3,94 $\pm$ 1,70	0,13	"	0,99	0,321
G1197	3,72 $\pm$ 1,38	0,15			
<b>Nº mitoc:</b>					
G1191	1,81 $\pm$ 2,18	0,17	"	0,13	0,8981
G1197	1,77 $\pm$ 2,38	0,26			
<b>Ár. mitoc:</b>					
G1191	0,11 $\pm$ 0,14	0,01	"	-0,25	0,8002
G1197	0,12 $\pm$ 0,19	0,02			

<b>% ár mitoc:</b>					
<b>G1191</b>	14,06±16,06	1,23	"	0,27	0,7861
<b>G1197</b>	13,49±14,03	1,55			
<b>Long. aposic:</b>					
<b>G1191</b>	0,92±0,63	0,05	"	0,05	0,9576
<b>G1197</b>	0,92±0,48	0,05			
<b>% aposición:</b>					
<b>G1191</b>	23,65±10,35	0,79	"	-1,45	0,1477
<b>G1197</b>	25,72±11,18	1,23			

III\* Terminales marcadas sobre dendrita: (Población General)

	Media ± S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Diám dend:</b>					
<b>G1191</b>	1,94±1,08	0,09	189(131+60)	2,07	0,0402*
<b>G1197</b>	1,60±0,99	0,13			
<b>Área axonal:</b>					
<b>G1191</b>	0,81±0,57	0,05	190(131+61)	-1,33	0,1839
<b>G1197</b>	0,96±0,96	0,12			
<b>Perím. axón:</b>					
<b>G1191</b>	4,44±1,56	0,14	"	-1,6	0,1112
<b>G1197</b>	4,92±2,60	0,33			
<b>Nº mitoc:</b>					
<b>G1191</b>	2,12±2,11	0,18	"	-1,77	0,0777
<b>G1197</b>	2,82±3,28	0,42			
<b>Ár. mitoc:</b>					
<b>G1191</b>	0,13±0,14	0,01	"	-1,23	0,2188
<b>G1197</b>	0,16±0,23	0,03			
<b>% ár mitoc:</b>					
<b>G1191</b>	13,12±10,84	0,95	"	-0,69	0,4897
<b>G1197</b>	14,32±11,99	1,54			
<b>Long. aposic:</b>					
<b>G1191</b>	1,17±0,61	0,05	188(131+59)	-1,75	0,0815
<b>G1197</b>	1,36±0,85	0,11			
<b>% aposición:</b>					
<b>G1191</b>	26,11±8,78	0,77	"	-1,61	0,1083
<b>G1197</b>	28,47±10,49	1,37			



**3.1. Diferencias en función de la localización de la terminal:**

i. Diferencias entre lado ipsi y contralateral al lugar de inyección

I\* Terminales sobre neurona marcada (Población general)

	Media $\pm$ S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Área axonal:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	0,64 $\pm$ 0,44	0,02	477(349+130)	-0,39	0,6988
<b>Contralateral</b>	0,65 $\pm$ 0,49	0,04			
<b>Perímetro axón:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	3,81 $\pm$ 1,39	0,07	..	0,34	0,7344
<b>Contralateral</b>	3,76 $\pm$ 1,53	0,13			
<b>Nº mitoc:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	1,99 $\pm$ 2,36	0,13	480(349+133)	-1,18	0,2395
<b>Contralateral</b>	2,29 $\pm$ 2,6	0,23			
<b>SÓLO G1191 Y G1197</b>					
<b>Área mitoc:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	0,12 $\pm$ 0,15	0,01	343(212+133)	-0,61	0,5443
<b>Contralateral</b>	0,13 $\pm$ 0,16	0,01			
<b>SÓLO G1191 Y G1197</b>					
<b>% área mitoc:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	15,81 $\pm$ 14,36	0,99	340(212+130)	-0,79	0,4325
<b>Contralateral</b>	17,06 $\pm$ 14,09	1,24			
<b>Long. aposic</b>					
<b>Ipsilateral</b>	1,24 $\pm$ 0,59	0,03	479(348+133)	3,05	0,0024***
<b>Contralateral</b>	1,06 $\pm$ 0,57	0,05			
<b>SÓLO G1155 Y G1191</b>					
<b>% aposición</b>					
<b>Ipsilateral</b>	32,70 $\pm$ 9,20	0,71	298(170+130)	3,90	0,0001***
<b>Contralateral</b>	28,28 $\pm$ 10,37	0,91			

II\* Terminales sobre dendrita marcada (Población general)

	Media $\pm$ S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Diámetro dend:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	1,99 $\pm$ 1,04	0,09	242(138+106)	-1,12	0,2656
<b>Contralateral</b>	2,15 $\pm$ 1,16	0,11			

<b>Área axonal:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	0,72±0,57	0,05	251(147+106)	1,23	0,2182
<b>Contralateral</b>	0,64±0,5	0,05			
<b>Perím.axón:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	3,99±1,7	0,14	"	1,47	0,1441
<b>Contralateral</b>	3,69±1,44	0,14			
<b>Nº mitoc:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	2,03±2,33	0,19	"	1,95	0,0519
<b>Contralateral</b>	1,47±2,08	0,2			
<b>Ár. mitoc:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	0,13±0,18	0,01	"	2,24	0,0261*
<b>Contralateral</b>	0,09±0,13	0,01			
<b>% ár mitoc:</b>					
<b>Ipsilateral</b>	15,44±17,04	1,41	"	1,92	0,0564
<b>Contralateral</b>	11,70±12,56	1,22			
<b>Long. aposic</b>					
<b>Ipsilateral</b>	0,99±0,65	0,05	"	2,05	0,0414*
<b>Contralateral</b>	0,84±0,46	0,04			
<b>% aposición</b>					
<b>Ipsilateral</b>	24,99±11,13	0,92	"	1,18	0,2406
<b>Contralateral</b>	23,39±9,91	0,96			

## ii. Diferencias entre niveles rostral, medio y caudal

I\* Terminales sobre neurona marcada: (Población general)

- Área axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,22	0,11	0,53
En los grupos	476	98,52	0,21	p=0,5875
Total	478	98,74		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	167	0,65	0,45	0,03
Medio	86	0,60	0,4	0,04
Caudal	226	0,65	0,48	0,03

- Perímetro axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	6,7	3,35	1,65
En los grupos	476	967	2,03	p=0,1933
Total	478	973,7		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	167	3,79	1,44	0,11

Medio	86	3,56	1,14	0,12
Caudal	226	3,89	1,51	0,1

- Número de mitocondrias:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	3,8	1,9	0,32
En los grupos	479	2835,51	5,92	p=0,7256
Total	481	2839,31		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	170	2,19	2,45	0,19
Medio	86	1,99	2,5	0,27
Caudal	226	2,02	2,39	0,16

- Área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,15	0,07	3,7
En los grupos	479	9,60	0,02	p=0,0254
Total	481	9,75		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	170	0,13	0,15	0,01
Medio	86	0,08	0,09	0,01
Caudal	226	0,12	0,15	0,01
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Rostral vs. Medio	0,05	0,04**(0,05)	3,63*	
Rostral vs. Caudal	0,01	0,03	0,36	
Medio vs. Caudal	-0,04	0,04*	2,28	

- Porcentaje de área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	1690	845	4,73
En los grupos	476	85057,15	178,69	p=0,0093
Total	478	86747,15		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	167	16,75	14	1,08
Medio	86	11,36	10,49	1,13
Caudal	226	14,32	13,85	0,92
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Rostral vs. Medio	5,39	3,49**(4,59)	4,61*	
Rostral vs. Caudal	2,42	2,68	1,58	
Medio vs. Caudal	-2,96	3,33	1,53	

- Longitud de aposición:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	6,06	3,03	9,08
En los grupos	478	159,57	0,33	p=0,0001
Total	480	165,63		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	170	1,11	0,57	0,04
Medio	86	1,04	0,44	0,05
Caudal	225	1,31	0,63	0,04
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	



Rostral vs. Medo	0,08	0,15	0,52	
Rostral vs. Caudal	-0,19	0,12*(0,15)	5,36*	
Medo vs. Caudal	-0,27	0,14*** (0,24)	6,81*	

- Porcentaje de aposición de la terminal: (SÓLO UTILIZAMOS LOS DATOS DE G1155 Y G1191)

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	1127,94	563,97	5,88
En los grupos	297	28506,03	95,98	p=0,0031
Total	299	29633,97		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	152	29,22	10,28	0,83
Medo	76	30,84	8,69	1,00
Caudal	72	34,03	9,85	1,16
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Rostral vs. Medo	-1,62	2,71	0,69	
Rostral vs. Caudal	-4,80	2,76*** (4,66)	5,87**	
Medo vs. Caudal	-3,18	3,17*	1,95	

II\* Terminales marcadas sobre dendrita en neuropilo: (Población general)

- Área axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	2,11	1,06	2,08
En los grupos	189	96,2	0,51	p=0,1281
Total	191	98,32		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	0,87	0,69	0,07
Medo	29	1,07	1,19	0,22
Caudal	70	0,75	0,43	0,05

- Perímetro axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	20,99	10,5	2,78
En los grupos	189	713,4	3,77	p=0,0645
Total	191	734,39		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	4,64	2,03	0,21
Medo	29	5,25	2,86	0,53
Caudal	70	4,25	1,23	0,15

- Número de mitocondrias:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	30,48	15,24	2,37
En los grupos	189	1212,84	6,42	p=0,0958
Total	191	1243,31		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	2,38	2,39	0,25
Medo	29	3,17	3,79	0,7
Caudal	70	1,96	2,03	0,24

## -Área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,03	0,01	0,47
En los grupos	189	5,81	0,03	p=0,625
Total	191	5,84		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	0,14	0,16	0,02
Medio	29	0,16	0,22	0,04
Caudal	70	0,13	0,17	0,02

## - Porcentaje de área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	93,7	46,85	0,37
En los grupos	189	23870,76	126,3	p=0,6906
Total	191	23964,47		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	12,81	10,6	1,1
Medio	29	14,61	12,26	2,28
Caudal	70	13,95	11,63	1,39

## - Longitud de aposición:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	1,29	0,65	1,33
En los grupos	187	90,63	0,48	p=0,2664
Total	189	91,92		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	1,26	0,8	0,08
Medio	28	1,36	0,72	0,14
Caudal	69	1,13	0,5	0,06

## - Porcentaje de aposición de la terminal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	33,84	16,92	0,19
En los grupos	187	16598,43	88,76	p=0,8266
Total	189	16632,27		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	26,77	9,34	0,97
Medio	28	27,82	11,48	2,17
Caudal	69	26,54	8,59	1,03

## - Diámetro de dendrita:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	8,25	4,12	3,74
En los grupos	188	207,14	1,1	p=0,0255
Total	190	215,39		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Rostral	93	1,95	1,1	0,11
Medio	28	1,34	0,69	0,13
Caudal	70	1,88	1,1	0,13
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Rostral vs.Medio	0,61	0,45*(0,59)	3,65*	
Rostral vs.Caudal	0,07	0,33	0,1	

Medo vs. Caudal	-0,54	0,46*	2,62	
-----------------	-------	-------	------	--

### 3.2. Diferencias según la estructura postsináptica:

*!Diferencias entre terminales sobre soma y dendrita proximal*

!\*Terminales sobre neurona marcada:

A.Población general

	Media $\pm$ S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Área axonal:</b>					
-Soma	0,63 $\pm$ 0,44	0,03	476(296+182)	-0,64	0,5247
-Dend prox	0,66 $\pm$ 0,48	0,04			
<b>Perím.axón:</b>			..	0,07	0,9405
-Soma	3,8 $\pm$ 1,38	0,08			
-Dend prox	3,79 $\pm$ 1,51	0,11			
<b>Nº mitoc:</b>			479(299+182)	1,56	0,1198
-Soma	2,21 $\pm$ 2,56	0,15			
-Dend prox:	1,85 $\pm$ 2,19	0,16			
<b><u>SÓLO G1191</u></b>					
<b><u>Y G1197</u></b>					
<b>Ár. mitoc:</b>					
-Soma	0,13 $\pm$ 0,16	0,01	342(213+131)	0,70	0,4874
-Dend prox	0,12 $\pm$ 0,15	0,01			
<b><u>SÓLO G1191</u></b>					
<b><u>Y G1197</u></b>					
<b>% ár mitoc:</b>					
-Soma	17,18 $\pm$ 14,46	1,00	339(210+131)	1,50	0,1357
-Dend prox	14,81 $\pm$ 13,88	1,21			
<b>Long. aposic</b>					
-Soma	1,20 $\pm$ 0,57	0,03	479(299+182)	0,62	0,5339
-Dend prox	1,17 $\pm$ 0,62	0,05			
<b><u>SÓLO G1155</u></b>					
<b><u>Y G1191</u></b>					
<b>% aposición</b>					
-Soma	31,28 $\pm$ 9,88	0,71	298(195+105)	1,16	0,2457
-Dend prox	29,88 $\pm$ 10,07	0,98			



B. Considerando solamente aquellas en que se observa contacto sináptico en el plano de corte:

	Media $\pm$ S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Área axonal:</b>					
-Soma	0,72 $\pm$ 0,49	0,06	113(69+46)	-0,4	0,6894
-Dend prox	0,75 $\pm$ 0,45	0,07			
<b>Perím. axón:</b>					
-Soma	4,03 $\pm$ 1,29	0,15	..	-0,28	0,7762
-Dend prox	4,11 $\pm$ 1,38	0,2			
<b>Nº mitoc:</b>					
-Soma	2,90 $\pm$ 3,42	0,41	..	0,91	0,3636
-Dend prox:	2,35 $\pm$ 2,76	0,41			
<b>SÓLO G1191 Y G1197</b>					
<b>Ár. mitoc:</b>					
-Soma	0,16 $\pm$ 0,18	0,03	77(46+33)	-0,31	0,7556
-Dend prox	0,17 $\pm$ 0,17	0,03			
<b>SÓLO G1191 Y G1197</b>					
<b>% ár mitoc:</b>					
-Soma	17,54 $\pm$ 13,04	1,92	..	-0,51	0,6081
-Dend prox	19,07 $\pm$ 12,87	2,24			
<b>Long. aposic</b>					
-Soma	1,45 $\pm$ 0,56	0,07	113(69+46)	1,02	0,3101
-Dend prox	1,33 $\pm$ 0,61	0,09			
<b>SÓLO G1155 Y G1191</b>					
<b>% aposición</b>					
-Soma	35,75 $\pm$ 8,38	1,31	71(41+32)	2,04	0,0454*
-Dend prox	31,60 $\pm$ 8,96	1,58			
<b>Zona activa:</b>					
-Soma	0,21 $\pm$ 0,10	0,01	109(67+44)	-1,37	0,1737
-Dend prox	0,24 $\pm$ 0,08	0,01			

ii. Diferencias entre los diferentes diámetros de dendrita

1\* Terminales sobre dendrita marcada en neuropilo de entre 0,1 y 1  $\mu$ m, de entre 1 y 2  $\mu$ m y de más de 2  $\mu$ m:

A. Población general:

- Área axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	2	1	3,62

En los grupos	241	66,73	0,28	p=0,0283
Total	243	68,74		
<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Media</b>	<b>Desviac estándar</b>	<b>Error estándar</b>
Menos de 1µm	44	0,49	0,29	0,04
Entre 1 y 2µm	82	0,69	0,52	0,06
Más de 2µm	118	0,74	0,59	0,05
<b>Comparación</b>	<b>Diferencia media</b>	<b>Fisher PLSD</b>	<b>Scheffe F-test</b>	
<1 y entre 1-2µm	-0,19	0,19*	1,94	
<1 y >2µm	-0,25	0,18**(0,24)	3,6*	
Entre 1-2 y >2µm	-0,06	0,15	0,27	

- Perímetro axonal:

<b>Origen de la variac</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-test</b>
Entre grupos	2	27,48	13,74	5,54
En los grupos	241	597,75	2,48	p=0,0044
Total	243	625,23		
<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Media</b>	<b>Desviac estándar</b>	<b>Error estándar</b>
Menos de 1µm	44	3,13	1,08	0,16
Entre 1 y 2µm	82	3,98	1,6	0,18
Más de 2µm	118	4,02	1,71	0,16
<b>Comparación</b>	<b>Diferencia media</b>	<b>Fisher PLSD</b>	<b>Scheffe F-test</b>	
<1 y entre 1-2µm	-0,85	0,58**(0,76)	4,14*	
<1 y >2µm	-0,89	0,55**(0,72)	5,1**	
Entre 1-2 y >2µm	-0,04	0,45	0,02	

- Número de mitocondrias:

<b>Origen de la variac</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-test</b>
Entre grupos	2	31,16	15,58	3,78
En los grupos	241	992	4,12	p=0,0241
Total	243	1023,16		
<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Media</b>	<b>Desviac estándar</b>	<b>Error estándar</b>
Menos de 1µm	44	1,02	1,11	0,17
Entre 1-2µm	82	1,63	1,88	0,21
Más de 2µm	118	2	2,36	0,22
<b>Comparación</b>	<b>Diferencia media</b>	<b>Fisher PLSD</b>	<b>Scheffe F-test</b>	
<1 y entre 1-2µm	-0,61	0,75	1,3	
<1 y >2µm	-0,98	0,71**(0,93)	3,72*	
Entre 1-2 y >2µm	-0,37	0,57	0,79	

- Área mitocondrial:

<b>Origen de la variac</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-test</b>
Entre grupos	2	0,11	0,06	3,1
En los grupos	241	4,38	0,02	p=0,047
Total	243	4,49		
<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Media</b>	<b>Desviac estándar</b>	<b>Error estándar</b>
Menos de 1µm	44	0,07	0,07	0,01
Entre 1-2µm	82	0,1	0,13	0,01
Más de 2µm	118	0,12	0,16	0,01
<b>Comparación</b>	<b>Diferencia media</b>	<b>Fisher PLSD</b>	<b>Scheffe F-test</b>	
<1 y entre 1-2µm	-0,04	0,05	1,09	
<1 y >2µm	-0,06	0,05*	3,05*	

Entre 1-2 y >2µm	-0,02	0,04	0,62	
------------------	-------	------	------	--

- Porcentaje de área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	198,43	99,22	0,43
En los grupos	241	55820,13	231,62	p=0,6521
Total	243	56018,57		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	44	11,5	12,2	1,84
Entre 1-2µm	82	14,08	18,52	2,05
Más de 2µm	118	13,53	13,6	1,25

- Longitud de aposición:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	8,5	4,25	13,48
En los grupos	241	76	0,32	p=0,0001
Total	243	84,5		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	44	0,53	0,28	0,04
Entre 1-2µm	82	1	0,61	0,07
Más de 2µm	118	1,02	0,6	0,06
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
<1 y entre 1-2µm	-0,47	0,21*** (0,35)	10,08***	
<1 y >2µm	-0,49	0,20*** (0,33)	12,42***	
Entre 1-2 y >2µm	-0,02	0,16	0,04	

- Porcentaje de aposición de la terminal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	2671,76	1335,88	13,08
En los grupos	241	24609,12	102,11	p=0,0001
Total	243	27280,88		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	44	17,33	7,23	1,09
Entre 1-2µm	82	25,94	11,15	1,23
Más de 2µm	118	25,93	10,25	0,94
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
<1 y entre 1-2µm	-8,61	3,72*** (6,29)	10,4***	
<1 y >2µm	-8,6	3,52*** (5,95)	11,61***	
Entre 1-2 y >2µm	0,01	2,86	3,71E-5	

II\* Terminales marcadas sobre los distintos tamaños de dendrita:

En la población general de terminales:

- Área axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	2,61	1,3	2,57
En los grupos	188	95,13	0,51	p=0,0789
Total	190	97,73		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	40	0,65	0,46	0,07
Entre 1-2µm	89	0,96	0,89	0,09



Más de 2µm	62	0,83	0,52	0,07
------------	----	------	------	------

## - Perímetro axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	24,67	12,34	3,28
En los grupos	188	706,53	3,76	p=0,0397
Total	190	731,2		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	40	3,97	1,75	0,28
Entre 1-2µm	89	4,9	2,27	0,24
Más de 2µm	62	4,51	1,47	0,19
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
<1 y entre 1-2µm	-0,94	0,73*	3,22*	
<1 y >2µm	-0,54	0,78	0,95	
Entre 1-2 y >2µm	0,4	0,63	0,76	

## - Número de mitocondrias:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	88,99	44,5	7,54
En los grupos	188	1109,78	5,9	p=0,0007
Total	190	1198,77		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	40	1,38	1,1	0,17
Entre 1-2µm	89	3,01	3,05	0,32
Más de 2µm	62	1,9	1,99	0,25
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
<1 y entre 1-2µm	-1,64	0,91*** (1,55)	6,26**	
<1 y >2µm	-0,53	0,97	0,57	
Entre 1-2 y >2µm	1,11	0,79** (1,05)	3,8*	

## - Área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,16	0,08	2,82
En los grupos	188	5,37	0,03	p=0,0621
Total	190	5,53		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	40	0,08	0,09	0,01
Entre 1-2µm	89	0,16	0,19	0,02
Más de 2µm	62	0,13	0,17	0,02

## - Porcentaje de área mitocondrial:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	271,71	135,85	1,12
En los grupos	188	22841,8	121,5	p=0,329
Total	190	23113,51		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	40	11,45	10,33	1,63
Entre 1-2µm	89	14,49	10,59	1,12
Más de 2µm	62	12,92	12,02	1,53

- Longitud de aposición:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	5,71	2,86	6,19
En los grupos	187	86,21	0,46	p=0,0025
Total	189	91,92		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	39	0,88	0,58	0,09
Entre 1-2µm	89	1,32	0,79	0,08
Más de 2µm	62	1,31	0,55	0,07
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
<1 y entre 1-2µm	-0,43	0,26**(0,34)	5,52**	
<1 y >2µm	-0,42	0,27**(0,36)	4,65*	
Entre 1-2 y >2µm	0,01	0,22	4,22E-3	

- Porcentaje de aposición de la terminal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	1052,57	526,29	6,32
En los grupos	187	15579,69	83,31	p=0,0022
Total	189	16632,27		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Menos de 1µm	39	22,55	8,78	1,41
Entre 1-2µm	89	27,12	9,67	1,03
Más de 2µm	62	29,14	8,51	1,08
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
<1 y entre 1-2µm	-4,56	3,46**(4,56)	3,39*	
<1 y >2µm	-6,59	3,68*** (6,24)	6,24**	
Entre 1-2 y >2µm	-2,03	2,98	0,9	

### 3.3. Diferencias entre terminales marcadas sobre dendrita en neuropilo, procedentes de RMc y terminales sobre dendrita marcada en neuropilo de origen diverso:

Cuando se realizó un estudio estadístico comparativo entre las características del grupo de terminales anterógradamente marcadas sobre dendrita en neuropilo, procedentes de RMc cuanto menos en su mayoría, con el grupo de terminales no marcadas, (de origen presumiblemente diverso y en todo caso con sus somas de origen no en RMc, o de neuronas en todo caso de algún modo distintas puesto que de ubicarse en RMc no habrían captado trazador), sobre dendrita retrógradamente marcada con BDA (test t de Student no pareado de dos colas):

	Media ± S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Diámetro dend</b>					
Term marc	1,84±1,06	0,08	433(191+244)	2,18	0,0302*
Dend marc	2,06±1,10	0,07			
<b>Área axonal:</b>					
Term marc	0,86±0,72	0,05	443(192+253)	-2,84	0,0047**
Dend marc	0,69±0,54	0,03			
<b>Perím. axón:</b>					
Term marc	4,59±1,96	0,14	"	-4,27	0,0001****
Dend marc	3,87±1,6	0,1			

<b>Nº mitoc:</b>					
<b>Term marc</b>	2,34±2,55	0,18	"	-2,41	0,0164*
<b>Dend marc</b>	1,79±2,24	0,14			
<b>Ár. mitoc:</b>					
<b>Term marc</b>	0,14±0,17	0,01	"	-1,36	0,1737
<b>Dend marc</b>	0,11±0,16	0,01			
<b>% ár mitoc:</b>					
<b>Term marc</b>	13,50±11,2	0,81	"	0,29	0,7754
<b>Dend marc</b>	13,87±15,41	0,97			
<b>Long. aposic</b>					
<b>Term marc</b>	1,23±0,7	0,05	441(190+253)	-4,95	0,0001***
<b>Dend marc</b>	0,92±0,58	0,04			
<b>% aposición</b>					
<b>Term marc</b>	26,84±9,38	0,68	"	-2,59	0,0098***
<b>Dend marc</b>	24,32±10,65	0,67			

B. Cuando comparamos aisladamente las terminales sobre dendrita marcada y terminales marcadas sobre dendrita en que se apreciaba contacto sináptico:

	Media ± S.D.	Error estándar	df	t	p
<b>Diámetro dend</b>					
<b>Term marc</b>	1,78±0,97	0,15	107(45+64)	0,31	0,7593
<b>Dend marc</b>	1,84±1,11	0,14			
<b>Área axonal:</b>					
<b>Term marc</b>	1,10±0,95	0,14	109(46+65)	-2,49	0,0143*
<b>Dend marc</b>	0,75±0,51	0,06			
<b>Perím. axón:</b>					
<b>Term marc</b>	5,06±2,06	0,3	"	-2,5	0,0139*
<b>Dend marc</b>	4,20±1,56	0,19			
<b>Nº mitoc:</b>					
<b>Term marc</b>	3,15±3,22	0,48	"	-2,41	0,0176*
<b>Dend marc</b>	1,98±1,86	0,23			
<b>Ár. mitoc:</b>					
<b>Term marc</b>	0,18±0,18	0,03	"	-1,94	0,055
<b>Dend marc</b>	0,13±0,14	0,02			
<b>% ár mitoc:</b>					
<b>Term marc</b>	15,97±10,15	1,50	"	-0,22	0,825
<b>Dend marc</b>	15,46±13,15	1,63			



Long. aposic Term marc	1,24±0,54	0,08	108(45+65)	-2,08	0,0401*
Dend marc	1,02±0,56	0,07			
% aposición Term marc	25,30±8,71	1,30	"	-0,61	0,546
Dend marc	24,20±9,69	1,20			

### 3.4. Diferencias en función del contacto sináptico establecido: simétrico, asimétrico, y sin contacto sináptico en el plano de corte.

Realizando un análisis de la varianza entre la población total de terminales sobre neurona marcada:

- Área axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	3,33	1,66	8,99
En los grupos	287	53,14	0,19	p=0,0002
Total	289	56,47		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Simétrica	52	0,82	0,59	0,08
Asimétrica	112	0,67	0,43	0,04
No existe	126	0,53	0,35	0,03
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Simét vs. Asimét	0,15	0,14*	2,16	
Simét vs. Noexiste	0,29	0,14*** (0,24)	8,41***	
Asimt vs. Noexiste	0,14	0,11*	3,18*	

- Perímetro axonal:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	35,94	17,97	10,47
En los grupos	287	492,42	1,72	p=0,0001
Total	289	528,36		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Simétrica	52	4,33	1,49	0,21
Asimétrica	112	3,95	1,29	0,12
No existe	126	3,41	1,24	0,11
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Simét vs. Asimét	0,38	0,43	1,49	
Simét vs. Noexiste	0,92	0,42*** (0,72)	9,02***	
Asimt vs. Noexiste	0,54	0,33** (0,44)	4,99**	

- Número de mitocondrias:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	48,56	24,28	3,85
En los grupos	288	1816,79	6,31	p=0,0224
Total	290	1865,35		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Simétrica	52	2,98	3,19	0,44
Asimétrica	112	2,21	2,63	0,25
No existe	127	1,83	2,05	0,18

Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Simét vs. Asimét	0,78	0,83	1,69	
Simét vs.Noexiste	1,15	0,81**(1,07)	3,84*	
Asimét vs. Noexiste	0,37	0,64	0,65	

- Área mitocondrial: (SÓLO UTILIZAMOS LOS DATOS DE G1155 Y G1191)

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	0,22	0,11	4,86
En los grupos	215	4,97	0,02	p=0,0086
No existe	217	5,20		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Simétrica	41	0,19	0,22	0,03
Asimétrica	73	0,14	0,15	0,02
No existe	104	0,11	0,12	0,01
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Simét vs. Asimét	0,06	0,06	1,82	
Simét vs.Noexiste	0,09	0,06**(0,07)	4,83**	
Asimét vs.Noexiste	0,03	0,05	0,86	

- Porcentaje de área mitocondrial: (SÓLO UTILIZAMOS LOS DATOS DE G1155 Y G1191)

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	40,72	20,36	0,1
En los grupos	214	45150,9	210,99	p=0,908
Total	216	45191,62		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Simétrica	41	18,15	12,48	1,95
Asimétrica	73	17,16	12,85	1,50
No existe	103	16,99	16,28	1,60

- Longitud de aposición:

Origen de la variac	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-test
Entre grupos	2	9,8	4,9	16,78
En los grupos	288	84,05	0,29	p=0,0001
Total	290	93,85		
Grupo	Número	Media	Desviac estándar	Error estándar
Simétrica	52	1,45	0,64	0,09
Asimétrica	112	1,32	0,52	0,05
No existe	127	1	0,51	0,05
Comparación	Diferencia media	Fisher PLSD	Scheffe F-test	
Simét vs. Asimét	0,13	0,18	1	
Simét vs.No existe	0,45	0,18*** (0,30)	12,59***	
Asimét vs. Noexiste	0,32	0,14*** (0,23)	10,32***	